



TESIS DE DOCTORADO

**Búsqueda de marcadores –en orina,
pelo y otras muestras biológicas–
que permitan diferenciar el uso
tradicional de la hoja de coca
del consumo ilícito de cocaína.**

Nélida Cristina Rubio

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE CIENCIAS DE LA SALUD PROGRAMA
DE DOCTORADO EN AVANCES Y NUEVAS ESTRATEGIAS EN CIENCIAS FORENSES

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2021





DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Nélida Cristina Rubio**

Título da tese: **Búsqueda de marcadores -en orina, pelo y otras muestras biológicas- que permitan diferenciar el uso tradicional de la hoja de coca del consumo ilícito de cocaína.**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, 8 de abril de 2021.





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Título de la tesis: **Búsqueda de marcadores -en orina, pelo y otras muestras biológicas- que permitan diferenciar el uso tradicional de la hoja de coca del consumo ilícito de cocaína.**

D^a. **Ana María Bermejo -Barrera (PhD)** (USC) (director y tutor)

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D^a. Nélida Cristina Rubio, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Santiago de Compostela, 29 de marzo de 2021





AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR

AUTHORIZATION OF THE DIRECTOR

Thesis title: Search for markers -in urine, hair and other biological samples- that allow differentiating the traditional use of the coca leaf from the illicit consumption of cocaine.)

D. Fritz Pragst (PhD) (University Medicine Charité- Berlín) (director)

INFORMAN (Reports)

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D^a. Nérida Cristina Rubio, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

(That this thesis corresponds to the work done by D^a. Nelida Cristina Rubio, under my direction, and I authorize its presentation, considering that it meets the requirements demanded in the Regulations for Doctoral Studies of the USC, and that as director of this does not incur the causes of abstention established in Law 40/2015.)

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declara también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de Monográfica con reproducción de publicaciones, en los que la participación del doctorando/a fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

(In accordance with what is indicated in the Regulations for Doctoral Studies, it also declares that this doctoral thesis is suitable to be defended based on the modality of Monographic with reproduction of publications, in those in which the participation of the doctoral student was decisive for its preparation and the publications are in line with the Research Plan.)

Santiago de Compostela, March, 29, 2021.



DECLARACIONES DEL AUTOR DE LA TESIS

1. El autor declara no tener conflicto de intereses en la investigación que se presenta en esta tesis.

2. Las figuras, tablas y gráficos tomados de los trabajos científicos y que no son autoría del doctorando se coloca la fuente al pie de los mismos, algunas editoriales entregaron un número de licencia cuando se solicitó la autorización para su uso (se coloca al pie de la figura o tabla correspondiente el número de licencia), otras dieron permiso de usar las figuras/tablas para uso de tesis/exposición ejemplo figuras 4-3, 4-4, 4-7, 4-8, otro grupo de figuras no son copias exactas de sus originales, fueron modificadas por el doctorando ejemplo 4-2, 4-3, 4-4.

Las imágenes de paisajes, fotos de planta y figuras arqueológicas son versiones gratuitas copiadas de páginas web, y que poseen la licencia **CCL** (Creative Commons License) con autorización para ser copiadas y compartidas (You are free to: Share — copy and redistribute the material in any medium or format.), ejemplo: Imagen 2-1; 2-2; 2-3; 3-2, 3-3, 3-4 etc. Otras imágenes son fotos tomadas o conseguidas por el doctorando por ejemplo las fotos de las portadas, las fotos 5-1 a 5-3 y las fotos de laboratorio del capítulo 6. La mayoría de las figuras, tablas y diagramas de la tesis son diseños del autor de la tesis. Los diagramas de instrumentos marca Agilent fueron cedidos por la Directora técnica de Agilent Buenos Aires.

3. Todas las tomas de muestras biológicas de la presente tesis siguieron los principios éticos de la declaración de Helsinki para las investigaciones médicas en individuos humanos. Todos los participantes que aceptaron dar muestras de orina y/o pelo o fluido oral o plasma lo hicieron voluntariamente y fueron capaces de dar consentimiento informado previo al cual se les explico los objetivos del estudio y la importancia de la investigación, las tomas de muestras no implicaron en ningún momento riesgo para su salud. Todo el proceso de entrevista y toma de muestras fue supervisado por personal médico y se tomaron todas las

precauciones para resguardar la intimidad y la confidencialidad de la información personal de las personas que participaron de la investigación. En ningún momento el laboratorio conoció la identidad de los dadores de las muestras y en ningún caso fue posible trazar el origen de las muestras. Los participantes no recibieron ningún tipo de beneficio económico por su participación.

Las muestras de orina y pelo de mascadores de hojas de coca, bebedores de té de coca y consumidores de “PACO” (pasta base de coca) como así también sus entrevistas fueron realizadas en Argentina por profesionales médicos y entregadas al laboratorio en forma anónima. La firma del consentimiento informado de cada voluntario siguió los requerimientos de la Dirección Nacional de Protección de datos personales (DNPD-Argentina), arts. 5to y 6to de la Ley 25.326 de Argentina.

Los individuos que participaron de los estudios y que entregaron sus muestras (orina y pelo) no debieron en ninguna situación hacer cambios en su rutina diaria de vida, el mascado de hojas de coca y/o beber té de coca forma parte de sus hábitos normales, no le fue solicitado a los participantes ninguna modificación a los mismos. Mascar hojas de coca es una práctica frecuente en algunos países sudamericanos y no pone en riesgo la salud de las personas.

Las muestras de pelo del grupo de individuos consumidores de “PACO” (pasta base de coca) pertenecientes al Centro de rehabilitación “Fundación Convivir” de la ciudad de Buenos Aires fueron extraídas por los médicos a cargo de la atención de los pacientes: J.C. Gorlero y N. Poliansky siguiendo con las medidas de anonimato y privacidad que este tipo de estudios requiere. El estudio fue aprobado por la dirección de la Fundación Convivir a cargo de la Licenciada Mercedes Aranguren.

Las muestras de orina, pelo y fluido oral de origen forense, analizadas en esta tesis pertenecieron a muestras del trabajo de rutina de los laboratorios de toxicología forense y como el resto de las muestras fueron procesadas sin identificación.

AGRADECIMIENTOS

Los **agradecimientos** son parte obligada de toda tesis, pero para los cuales no existen reglas, guías o estándares que se deban seguir que nos aseguren no olvidar a nadie.

Estoy convencida que el recorrido a lo largo de la vida profesional es como ir subiendo una escalera, donde cada escalón es una mano que ayuda a seguir, otras veces son obstáculos que nos obligan a detenernos y posponer, como en mi caso, hacer una tesis doctoral casi al final de mi vida profesional y no al inicio como la mayoría lo hace. Son muchas las manos a las que debo agradecer por estar acá y seguramente no las nombraré a todas.

- Empezaré por mis padres, el primer escalón de mi vida, sin ellos todo esto no hubiera sido posible de realizar.

- A la **Dra. Ana María Bermejo-Barrera** quien sin muchos rodeos y pocas palabras aceptaría ayudarme a emprender lo que luego se convertiría en esta tesis, sería algo más que mi directora de tesis sino una gran amiga, no solo voy a agradecerle a Ana lo que me brindó en lo profesional, sin mezquindades compartió su saber y su laboratorio y lo puso a mi disposición, pero además me abrió la puerta de su casa y la de sus amigas (Sara, Concha, Cuqui) e hizo que Santiago de Compostela se convierta para mí en un lugar entrañable.

- Al **Dr. Fritz Pragst** de la Universidad de Charité de Berlín, a quien conocí en un curso que dictaba en Porto Alegre (Brasil), luego lo iría contactando en las reuniones de la TIAFT hasta que en un momento surgió la posibilidad de seguir nuestra investigación en pelo en su laboratorio de Berlín. Sería luego uno de mis directores de tesis, es un placer y un lujo contar con su conocimiento, experiencia y consejos y se del enorme esfuerzo que hizo al revisar la tesis en español teniendo que usar

un traductor al inglés y vaya un especial agradecimiento a su esposa Karin que es una fabulosa anfitriona y una compañera excepcional de salidas, supo con genialidad y picardía llenar los vacíos en la comunicación que a veces las dificultades en hablar lenguas distintas provocan.

- A la Dra. Sabina Strano-Rossi de la Universidad del Sacro Cuore (Roma) con quien compartí los primeros momentos de la investigación cuando todavía no sabíamos si íbamos a encontrar algún marcador de mascado de hojas de coca, ella desde su Laboratorio en Roma y yo desde Cipolletti (Patagonia) compartíamos los espectros de masa que íbamos obteniendo tratando de encontrar algún indicio que nos permitiera hacer una diferencia.... Y al final encontramos a nuestros dos marcadores que a lo largo de los estudios iríamos confirmando.

- A los integrantes del Instituto de Ciencias Forenses de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, la Dra. María Jesús Tabernero- Duque e Iván Álvarez-Freire con quienes compartí parte del camino de esta tesis, siempre hicieron tiempo para ayudarme en lo técnico y humano.

- A la Dra. Pilar Bermejo-Barrera que me permitió desarrollar parte de esta tesis en su cátedra y a todo su personal que me brindó hospitalidad y calidez durante mis varias asistencias y muy especialmente al Dr. Antonio Moreda-Piñeiro, por su compañerismo e infinita paciencia, colaboró conmigo y aceptó sin protestar hacer horas extras o concurrir hasta los domingos a asistirme.

- A la Dra. María Luisa Soria del Instituto Nacional de Toxicología y Ciencias Forenses de Sevilla, a quien le debo la amabilidad de presentarme a la Dra. Ana María Bermejo-Barrera.

- Al Dr. J.L. González médico laboral de la provincia de Salta y a los Dres. Mercedes Aranguren, Juan Carlos Gorlelo y Nicolás Poliansky de la Fundación Convivir de la ciudad de Buenos Aires quienes fueron parte imprescindible en la obtención de las muestras de orina y pelo de masticadores de hoja de coca y consumidores de PACO.

- A la Dra. Adriana Confalonieri directora del laboratorio químico de Analytical Technology de la provincia de Buenos Aires, quien desinteresadamente me brindó su conocimiento y equipos de cromatografía

masa tándem de la marca Agilent.

- A la Dra. Graciela Bassols de la cátedra de Botánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires quien gentilmente realizó el estudio botánico de las hojas de coca empleadas en alguno de nuestros estudios.

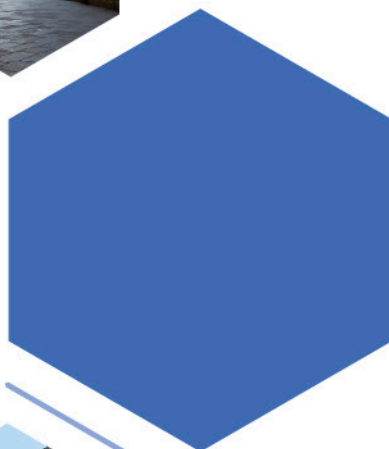
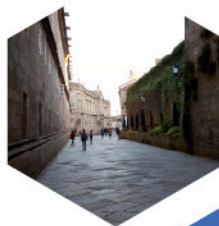
- A mis profesores, a muchos de ellos les debo mi inclinación a la bioquímica primero y a la toxicología después, Dres: Manuel Guatelli, Juan Carlos García Fernández, Edda Villamil y tantos otros.

- ¡¡¡Y gracias a mi suerte!!! No muchos tienen la oportunidad de hacer una tesis, pero muchos menos el poder hacerla con la colaboración de tres países como España, Italia y Alemania, ¡gracias a mi suerte! por encontrar gente de la calidad humana y profesional con la que compartí todo este trabajo que ahora presento, no solo aprendí y disfruté de estar en la hermosa Europa, cuna de mis abuelos, sino que hice amigos que perdurarán en el tiempo, he sido una doctoranda o una tesista como decimos en Argentina muy afortunada.



LABORATORIOS QUE BRINDARON SU COLABORACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.

Instituto de Medicina Legal, Facultad
de Medicina. Universidad de Santiago de
Compostela, Santiago de Compostela,
España.



Profesora
Dra. Ana María Bermejo-Barrera.
Directora de la tesis.



LABORATORIOS QUE BRINDARON SU COLABORACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.



Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología, Facultad de
Química. Universidad de Santiago de
Compostela, Santiago de Compostela,
España.



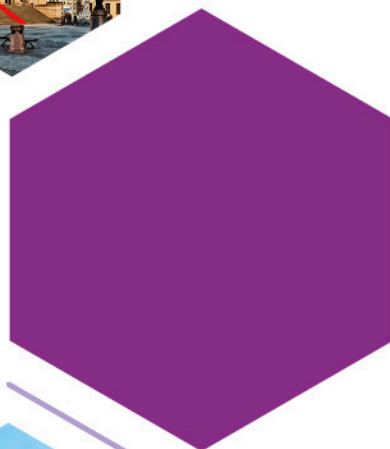
Profesora
Dra. Pilar Bermejo-Barrera.



LABORATORIOS QUE BRINDARON SU COLABORACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.



Instituto de Medicina Legal, Facultad de
Medicina. Universidad de Charité, Berlín,
Alemania.



Profesor Dr. Fritz Pragst.
Director de la tesis.



**LABORATORIOS
QUE BRINDARON
SU COLABORACIÓN
PARA LA REALIZACIÓN
DE ESTA TESIS.**



Instituto de Medicina Legal - Universidad
Católica del Sacro Cuore - Roma - Italia.



Profesora
Dra. Sabina Strano-Rossi



LABORATORIOS QUE BRINDARON SU COLABORACIÓN PARA LA REALIZACIÓN DE ESTA TESIS.



Cátedra de Botánica-Facultad de
Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires
Buenos Aires Argentina

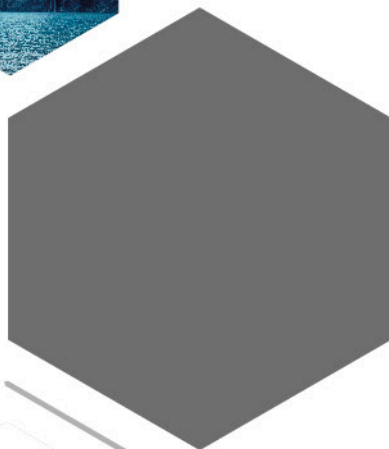


Profesora
Dra. Graciela Bassols



**LABORATORIOS
QUE BRINDARON
SU COLABORACIÓN
PARA LA REALIZACIÓN
DE ESTA TESIS.**

Laboratorio de Toxicología y Química
Legal (LATOQUIL), Cipolletti, Patagonia,
Argentina.





RESUMEN

El consumo de hojas de coca ya sea empleado para mascar como para tomar infusiones de té de coca constituye en Argentina y en otros países de Latinoamérica una práctica totalmente aceptada. En Argentina, además, una ley Federal legaliza su uso y tenencia si bien no su comercialización y cultivo. Como sabemos las hojas de coca son la materia prima para la obtención de la cocaína, droga ilegal de amplia distribución en el mundo y cuya producción viene de los países productores latinoamericanos como Colombia, Perú y Bolivia.

El mascar hojas de coca es una práctica milenaria en el mundo andino, es un ritual ancestral en donde las hojas de coca aportan valores medicinales y nutritivos al cuerpo, pero más importante la planta de coca forma parte de la identidad y cultura de varias naciones sudamericanas principalmente en Perú y Bolivia, este último contempla a la planta de coca en su constitución, así como su uso está protegido por varias leyes nacionales.

Mientras los organismos internacionales de control de drogas aún debaten si las hojas de coca deben permanecer bajo control, el uso tradicional de la hoja de coca continúa y se ha expandido en países como la Argentina, donde su uso se ha extendido a todas las clases sociales. Esto ha creado la necesidad, tanto en el ámbito judicial, laboral, como en el control de drogas de abuso en los conductores de transportes y aún en el doping, de tener que diferenciar si los resultados positivos a cocaína en las muestras de origen biológicos (orina, sangre, pelo, fluido oral, por ejemplo) son debidas a una práctica legal como el consumo de hojas o a un consumo ilegal de cocaína, penado por la ley.

Este trabajo de investigación trata de aportar desde el laboratorio herramientas que nos permitan a través de la búsqueda de marcadores hacer esta diferenciación. Se iniciará con la búsqueda e identificación estructural de dos alcaloides provenientes de la hoja de coca: higrina y cuscohigrina y posteriormente se analizará su utilidad en distintas muestras como la orina, pelo, fluido oral y plasma para dar respuesta al objetivo de diferenciar un consumo legal de otro ilegal.

Para ello se han validado los procedimientos analíticos necesarios para tal determinación en las diferentes muestras biológicas estudiadas, utilizando técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas.

Los resultados obtenidos han podido demostrar que diferenciar el consumo legal del ilegal de cocaína es posible, al poder determinar algunos compuestos que sirven como marcadores del consumo de hoja de coca.

PALABRAS CLAVES: Higrina, Cuscohigrina, alcaloides de la coca, cocaína, mascado de hojas de coca. CG/EM, CL/EM



ÍNDICE (CONTENTS)

I-INTRODUCCIÓN

CAPITULO 1- CONFIGURACIÓN DE LA TESIS.

1.1	¿Por qué se hace el estudio?42
1.2	Búsqueda bibliográfica.43
1.3	¿Dónde y con quién/es hacer el estudio? Lugar de realización de la tesis.44
1.4	¿Qué buscar?44
1.5	Comportamiento de la higrina y cuscohigrina en el proceso de extracción de las hojas de coca para la obtención de clorhidrato de cocaína.51
1.6	Higrina y cuscohigrina en pelo.53
1.7	Higrina y cuscohigrina en fluido oral.54
1.8	Estabilidad de la higrina y cuscohigrina en la orina.56
1.9	Comportamiento de la higrina y cuscohigrina en el pelo de fumadores de “PACO” de la Argentina y en mascaradores de hojas de coca y tomadores de té de coca ocasionales. La anhidroecgonina metil éster (AEME) un marcador de fumado de cocaína base a considerar en los consumidores de hoja de coca.57
1.10	Perfil en plasma de cocaína, benzoilecgonina y cuscohigrina de un mascarador de hojas de coca.59

CAPITULO 2- INTRODUCCIÓN - BREVE RECORRIDO HISTÓRICO DE LA COCA Y COCAÍNA - LA POSICIÓN DE NACIONES UNIDAS - IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTA TESIS

- RAZONES DE SU ELECCIÓN

2.1	Introducción y Breve recorrido histórico de la planta de coca.63
2.2	La posición de Naciones Unidas. Convención Única de estupefacientes de Naciones Unidas 1961. Antecedentes y acciones posteriores.71
2.3	La situación argentina del coqueo, un caso anómalo.74
2.4	Legislación Argentina de la hoja de coca.77
	Referencias80

CAPÍTULO 3- LA PLANTA DE COCA

3.1	Introducción83
3.2	Clasificación botánica de la planta de coca84
3.3	Características botánicas de las <i>Erythroxylum coca</i> L y <i>Erithroxylum novogranatense</i> (d. Morris) Hieron y sus variedades.89
3.4	Domesticación de la planta de coca-teorías.92
3.4.1	Teoría Evolutiva Lineal a partir de <i>Erythroxylum Coca</i> Var.Coca. (Un Ancestro En Común)92
3.4.2	Teoría Evolutiva del Ancestro Común Reciente Y Grupos Hermanos:93
3.4.3	Nuevas Teorías de la Domesticación de La Coca.96
3.5	Cultivo de la coca.96
3.5.1	Especies de <i>Erythroxilum</i> en Argentina y viabilidad de cultivo de las especies <i>Erythroxylum coca</i> Lam y <i>Erythroxylum novogranatense</i>97
3.6	Usos medicinales de la coca.102
3.6.1	Tratamiento síntomas gastrointestinales y salud oral.104
3.6.2	Efectos sobre el rendimiento, disminución del apetito, efectos metabólicos y cardiovasculares.104
3.6.2.1	Otros usos.105
3.7	Mascado de la hoja de coca.107
3.7.1	Sustancias alcalinas adicionadas a las hojas de coca.109
	Referencias.111

CAPÍTULO 4- LA QUÍMICA DE LA PLANTA DE COCA

4.1	Introducción.115
4.2	Alcaloides del aminoácido l-ornitina.116
4.3	Biosíntesis de higrina, cuscohigrina, cocaína y cinamoilcocaína.121
4.3.1	Biosíntesis de higrina y cuscohigrina.122
4.3.2	Biosíntesis de metilecgonina, cocaína y cinamoilcocaína.123
4.3.3	La tropinona punto en común en la síntesis de la higrina y cocaína.125
4.4	Contenido de alcaloides en planta de erythroxylum.126
4.5	Obtención de cocaína a partir de las hojas de erythroxylum.132
4.5.1	Obtención de la pasta de coca a partir de las hojas de coca.132
4.5.2	Obtención de la coca base a partir de la pasta de coca.136
4.5.3	Obtención del clorhidrato de cocaína a partir de coca base.137
4.5.4	“Paco”, “basuco”, “pasta base” formas de consumo de cocaína.141
4.6	Referencias.142

II-OBJETIVO DE LA TESIS

	Objetivo principal y secundarios.149
--	--	-----------------

III-METODOLOGIA

CAPÍTULO 5-TIPO DE MUESTRAS-PREPARACIÓN DE MUESTRAS-TÉCNICAS INSTRUMENTALES.

5.1	Introducción.157
5.2	Las muestras.158
5.2.1	Muestras biológicas de origen humano.163
5.2.1.1	Consideraciones éticas y legales en la toma de muestras	

	para estudio.163
5.2.1.2	Muestras biológicas de origen vegetal y no biológicas.164
5.3	Preparación de muestras.166
5.3.1	Preparación de muestras de orina.168
5.3.1.1	Generalidades168
5.3.1.2	Método de extracción líquido-líquido169
5.3.1.2.1	Consideraciones del método de extracción líquido-líquido.169
5.3.1.2.2	Discusión de los resultados de la extracción líquido-líquido.171
5.3.1.3	Método dilución- inyección (dilute-and-shoot)172
5.3.2	Preparación de las muestras de pelo.173
5.3.2.1	Generalidades.173
5.3.2.2	Aplicación del concepto del mecanismo de incorporación de drogas al pelo a la higrina, cuscohigrina y cinamoilcocaína.174
5.3.2.3	Etapas previas a la extracción de la/s droga/s del pelo.176
5.3.2.3.1	Lavado o descontaminación del pelo.177
5.3.2.3.2	Consideraciones previas del método de preparación de las muestras de pelo empleado en nuestros análisis.177
5.3.2.3.3	Breve descripción del método empleado de análisis de pelo.179
5.3.3	Preparación de las muestras de fluido oral.180
5.3.3.1	Generalidades.180
5.3.3.2	Mecanismos de paso de las drogas del fluido oral a la sangre y la situación en los masticadores de hojas de coca por el empleo de sustancias alcalinas.182
5.3.3.3	Consideraciones del método de preparación de muestras por precipitación de proteínas.182
5.3.3.4	Método de preparación del fluido oral empleado en nuestros análisis.183
5.3.4	Preparación de las muestras de plasma.185
5.3.4.1	Generalidades185
5.3.4.2	Consideraciones sobre el método de preparación de	

	muestras por fase estacionaria sólida. (SPE)186
5.3.4.3	Preparación de las muestras de plasma con la extracción en fase estacionaria (SPE) Strata™-X 33 µm Polymeric Sorbent.187
5.3.5	Preparación de las muestras biológicas de origen vegetal y no biológicas.191
5.3.5.1	Hojas de coca.191
5.3.5.2	Té de coca.193
5.3.5.3	Muestras de secuestro.193
5.3.5.4	Muestras de las distintas etapas de la producción clandestina de cocaína.193
5.4	Técnicas instrumentales.197
5.4.1	Técnicas instrumentales empleadas-Generalidades.197
5.4.2	Pasos desde el hallazgo, pasando por la identificación tentativa hasta la confirmación de los dos marcadores de mascado de hojas de coca: higrina y cuscohigrina.202
5.4.2.1	Cromatografía gaseosa con detector de masa (CGMS)202
5.4.2.2	Identificación tentativa de los compuestos “a” y “b”.203
5.4.2.2.1	Bibliotecas comerciales.203
5.4.2.2.2	Cromatografía gaseosa con detector masa.205
5.4.2.2.3	Índice de retención de Kovats211
5.4.2.2.4	Comparación con espectros obtenidos de extractos de hoja de coca.212
5.4.2.3	Confirmación estructural de los compuestos “a” y “b”.213
5.4.2.3.1	Testigo indubitable.213
5.4.2.3.2	Cromatografía líquida con detector de masa tiempo de vuelo. (LC-QTOF-MS)214
5.4.2.3.2.1	Generalidades214
5.4.2.3.2.2	Determinación de la masa exacta de la higrina y cuscohigrina.218
5.4.2.3.2.3	Hallazgo de dos metabolitos de la cuscohigrina. (CUS-M1 y CUS-M2).221
5.4.3	La elección de las columnas HILIC (hydrophilic interaction chromatography), paso fundamental para la	

	separación de la higrina y cuscohigrina en un LC-MSMS y LC-QTOF-MS.224
5.4.3.1	Generalidades de las columnas HILIC.224
5.4.3.2	Tipo de fases HILIC.226
5.4.3.3	Mecanismos de interacción de las columnas HILIC.228
5.4.3.4	Fase móvil, concentración de sales, pH y temperatura: cómo afectan en la elución de los analitos.229
5.4.3.5	El desarrollo de los métodos para la búsqueda de higrina y cuscohigrina en pelo y fluido oral empleando cromatografía líquida triple Q y columnas HILIC.231
5.4.4	Efecto Matriz239
5.4.4.1	Generalidades239
5.4.4.2	Medición del efecto matriz.240
5.4.4.3	Efecto matriz en los métodos empleados.241
	Anexo 1245
	Encuesta251
	Referencias252

IV-RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS

CAPÍTULO 6 -TRABAJOS PRESENTADOS- DISCUSIÓN

6.1	Introducción.261
6.2	Orden de presentación de los trabajos.262
6.3	Grupo A: Trabajos que muestran el distinto comportamiento de la higrina y cuscohigrina con respecto a la cocaína en el proceso de obtención ilegal de cocaína a partir de las hojas de coca.266
6.4	Grupo B: Estudios realizados en orina.279
6.4.1	Hallazgo de los marcadores de mascado de hojas de coca. Higrina y cuscohigrina. Estudio de una población de mascadores de hoja de coca del norte argentino, una población de consumidores de España y muestras de	

	secuestro o alijos de cocaína.279
6.4.2	Primeras investigaciones sobre la estabilidad del testigo de cuscohigrina y de los alcaloides higrina y cuscohigrina en orina.279
6.4.3	El empleo de sustancias alcalinas durante el mascado puede modificar el patrón de eliminación de los alcaloides en orina.285
6.5	Grupo C: Estudios realizados en pelo.317
6.5.1	Estudios del comportamiento de la higrina y cuscohigrina en pelo en una población de mascadores de hoja de coca (frecuentes y ocasionales) y bebedores de té de coca vs una población de consumidores de cocaína de Alemania y de un grupo de consumidores de “PACO” de Argentina en rehabilitación.317
6.5.2	Criterios de discriminación o diferenciación propuestos para diferenciar un mascador de consumo frecuente de hojas de coca de un consumidor de cocaína a través del análisis de pelo.322
6.5.3	La utilidad del pelo para diferenciar individuos que ocasionalmente mascan hojas de coca o beben té de coca vs consumidores de cocaína.322
6.5.4	Análisis del pelo de una población de adictos en tratamiento ambulatorio de la Argentina que fuman pasta base o pasta de coca o “PACO”. Utilidad de la anhidroecgonina metil éster (AEME) en los fumadores de PACO en Argentina.326
6.5.5	Cambios en la distribución de alcaloides de la coca en el pelo de mascadores de hoja de coca frecuentes, por el empleo de sustancias alcalinas en el mascado.328
6.6	Grupo D: Estudios realizados en fluido oral.356
6.6.1	Desarrollo de un método para determinar la presencia de higrina y cuscohigrina en fluido oral.356
6.6.2	Posibilidad de diferenciar a mascadores de hojas de coca y tomadores de té de coca de consumidores de	

	cocaína a través del fluido oral.356
6.7	Grupo E: Estudios realizados en plasma.376
6.7.1	Ventana de detección en plasma y orina de un mascarador de hojas de coca de cocaína, benzoilecgonina y cusco-higrina.376

V-CONCLUSIONES Y PROPUESTAS

CAPÍTULO 7-CONCLUSIONES Y PROPUESTAS

7.1	Avances (Progress)411
7.2	Dificultades (Difficulties)416
7.3	Propuestas (Proposals)417

VI-ANEXO

	Calidad de las publicaciones.425
	Autores, coautores de las publicaciones presentadas y su correspondiente filiación.426
	Contribución a las publicaciones del autor y coautores.427
	Links a las publicaciones.428
	Permisos y Licencias de publicaciones.429





I-INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

Capítulo 2

Capítulo 3

Capítulo 4





1.

CONFIGURACION DE LA TESIS.

“La ciencia: cinco por ciento de inspiración,
noventa y cinco por ciento de transpiración.”

Albert Einstein

Tal vez este sea un capítulo de lectura obligatoria o recomendada para quienes estén interesados en el tema de esta tesis, nos ayuda a clarificar su objetivo, los interrogantes que se fueron abriendo a lo largo de la investigación, como así también de las dificultades y necesidades que surgieron.

Cuando se está en la etapa de escribir la tesis en donde se supone se ha logrado dar respuesta a alguno/os de los interrogantes que se fueron presentando durante la investigación, supongo que se olvida como fueron los momentos iniciales a decidirse a empezar con el estudio, la sensación de desorientación, por dónde empezar, las dificultades que se fueron presentando, si valía la pena involucrarse en un tema como el de esta tesis en que algunos suponían la solución era casi imposible.

Creo importante por eso dedicar un capítulo a cómo está configurada esta tesis:

Claramente tendrá dos partes:

- Una primera parte en la que será necesario conocer el blanco de nuestros estudios: **la planta de coca y su uso ancestral**. Es necesario poner en contexto la problemática a estudiar con el medio donde se produce, sus raíces históricas con el mundo incaico, una planta que ha tenido desde la conquista española un debate constante y en los últimos 50 años ha sufrido continuos intentos de control internacional a través de la Comisión de Estupefacientes de Naciones Unidas. Argentina como

un país anómalo en el consumo de la hoja de coca y la legislación local que permitió su consumo contrariando la Convención de 1961 y las consecuencias de la legalización del mascado de la hoja de coca que obliga a los laboratorios de toxicología de Argentina a hacer la diferencia entre consumo legal de cocaína vs consumo ilegal lo que ha dado origen a esta tesis. A esto sumaremos un recorrido por los aspectos botánicos y químicos de la planta, necesarios para defender los resultados científicos hallados. Esta primera parte estará desarrollada en **los capítulos:**

- **Introducción.**
- **La planta de coca.**
- **La química de la coca.**

● Una segunda parte en la que se presentan los estudios científicos destinados a responder los objetivos de esta tesis y los nuevos interrogantes que fueron surgiendo, haciendo un repaso sobre las técnicas y muestras empleadas y terminando con una discusión y conclusiones sobre los resultados alcanzados. Esto se desarrollará en **los capítulos:**

- **Tipo de muestras - Preparación de muestras -Técnicas instrumentales.**
- **Trabajos presentados - Discusión.**
- **Conclusiones y Propuestas.**

Empezaremos entonces por explicar:

1-1 ¿Por qué se hace el estudio?

El hábito de mascar hojas de coca o beber té de coca es una práctica legal en Argentina y esto presentaba un claro problema en el ámbito judicial y en el laboral, digo presentaba porque a estas alturas esperamos haber dado respuesta a parte de este agujero que existía en la bibliografía; como veremos al final, nuevos interrogantes se han abierto.

Nuestro primer objetivo a dilucidar fue discernir si el resultado positivo a cocaína en una muestra de orina se debía a una práctica legal o a un consumo ilegal, luego se irían sumando nuevas preguntas y problemas de investigación.

Al finalizar esta tesis solo habremos resuelto parcialmente el objetivo inicial, aportado nuevos datos en respuesta a nuevos interrogantes que fueron surgiendo durante la investigación y planteado la necesidad de profundizar otros estudios como la necesidad de buscar un marcador de consumo ilícito de cocaína para diferenciar al que masca hoja de coca y además consume cocaína y seguir investigando la utilidad del marcador de fumado de cocaína: AEME (anhidro ecgonina metil ester) en el caso de los mascadores de hoja de coca entre otros.

🔍 **1-2 Búsqueda bibliográfica:** los primeros pasos fueron dados para indagar donde estábamos parados, que se conocía de este tema, qué información científica existía sobre la diferenciación del consumo legal de cocaína del ilegal. Busqué en las bases de datos tradicionales computarizadas: ScienceDirect, PubMed otros a través de palabras claves o key Word, ¿pero qué palabra/s o cuáles serían realmente una llave?, ensayé varias: “chewing coca leaves”, “coca leaves”, “coca alkaloids” etc., solicité también ayuda a una bibliotecaria profesional, pero no encontré ninguna información de trabajos previos que hubieran estudiado la manera de diferencia un mascador de hojas de coca de un consumidor de cocaína a través de análisis de laboratorio. Consulté también a médicos de empresas multinacionales, publicaciones locales médicas, pero nada pudieron aportarme sobre el tema. No quiero caer en la soberbia de decir que no había hasta esta tesis nada escrito sobre este tópico, porque bucear en el océano de información científica no es fácil y no hay receta para hacerlo y no puedo descartar mi falta de experiencia y destreza. La búsqueda de bibliografía y la lectura de trabajos científicos es una tarea que se inicia con la tesis y termina cuando se entrega, acompaña al doctorando en todo su trabajo, podía suponer que algo surgiría en algún momento.

En principio el resultado negativo de la búsqueda bibliográfica no parecía extraño si uno tiene en cuenta que no existían muchas motivaciones científicas o judiciales para estudiar el tema. Por un lado, el problema es claramente regional, (Argentina, Perú y Bolivia) en consecuencia para los países del 1er mundo que son los que tienen una mayor

producción científica es un problema inexistente porque tienen prohibido cualquier tipo de consumo de cocaína y, por otro lado, para los países sudamericanos en cuestión la convivencia del mascado de hojas de coca y el consumo ilegal no resultaba ser un problema judicial ni laboral sino hasta hace algunos años.

Hasta la realización de esta investigación en las cátedras de toxicología de las Universidades de Argentina se enseñaba que no había forma de diferenciar ambos tipos de consumo desde el laboratorio.

1-3 ¿Dónde y con quién/es hacer el estudio? Lugar de realización de la tesis.

Existía un claro problema a resolver que requería seguir una investigación científica, así lo exige la Justicia: “Resultados científicamente indiscutibles y legalmente defendibles”

Debía encontrar un ámbito académico para plantear el problema y donde hallar un principio de solución, si bien geográficamente estoy muy alejada del resto del mundo, (Patagonia- Argentina), por suerte para mí no fue difícil encontrar apoyo en Europa y en España más precisamente la Universidad de Santiago de Compostela fue quien primero me brindó un lugar de trabajo en el Instituto de Ciencias Forenses (USC), su titular la Dra. Ana Bermejo Barrera sería la tutora y directora de mi tesis, luego tendría apoyo del Instituto de Medicina Legal de la Universidad Católica del Sacro Cuore de Roma a cargo de la Dra. Sabina Strano-Rossi y finalmente se sumaría de la Universidad de Charite de Berlín el Dr. Fritz Pragst quien sería otro de mis directores de tesis. Mis obligaciones profesionales en Argentina no me permitieron ser una doctoranda a tiempo completo y parte de mi trabajo estuvo repartido entre Europa y Argentina.

1-4 ¿Qué buscar?

La orina fue la primera muestra sobre la que trabajamos. ¿Qué teníamos que buscar? Sino sabíamos contestar esta pregunta tampoco sabíamos cómo teníamos que extraer y cómo íbamos a identificar.

Era lógico pensar que una persona que masca hojas de coca ingre-

saría una mayor cantidad de compuestos químicos que la que consume el producto ya extraído como el clorhidrato de cocaína y las orinas deberían tener tal vez algún/os compuestos extras que el consumidor de cocaína. ¿Pero cuál buscar? De los muchos constituyentes de la hoja de coca sacando los alcaloides como cocaína, metilecgonina, no es mucha la información científica sobre los perfiles de los otros constituyentes de la hoja en muestras biológicas.

Empezamos haciendo los primeros ensayos con muestras de coqueiros y de voluntarios que aceptaron mascar hojas de cocas y entregarnos sus orinas. Usamos el mismo método de extracción líquido-líquido para drogas que empleábamos en el laboratorio y comenzamos a comparar nuestras primeras 5 orinas de mascadores con orinas de consumidores de cocaína de origen forense o laboral, además de extraer hojas de coca.

En todas las muestras de orina de coqueiros encontrábamos dos picos en cromatografía gaseosa-masa que no observábamos en la orina de consumidores, pero que si estaban en las hojas de coca extraídas. ¿Qué compuestos serían? Las bibliotecas comerciales NIST y la de Maurer-Pfleger-Muller **no resultaron de utilidad**, los compuestos que mostraban tenían un bajo match de 50 a 60% y variable en el compuesto que identificaba. Luego sabríamos que estos dos compuestos no estaban contenidos en ninguna de las dos bibliotecas comerciales.

La bibliografía mencionaba que las hojas de coca contenían cocaína, cinamoilcocaína (cis y trans) y metilecgonina que encontrábamos en los consumidores de cocaína, pero había otros dos alcaloides higrina y cuscohigrina que estaban en cantidades apreciables en la hoja de coca y que no eran mencionados ni en las orinas de los consumidores ni en las muestras de secuestro o alijos de cocaína. **(Gráfico 1-1)**

Annals of Botany 76: 331-335, 1995
EMANUEL L. JOHNSON

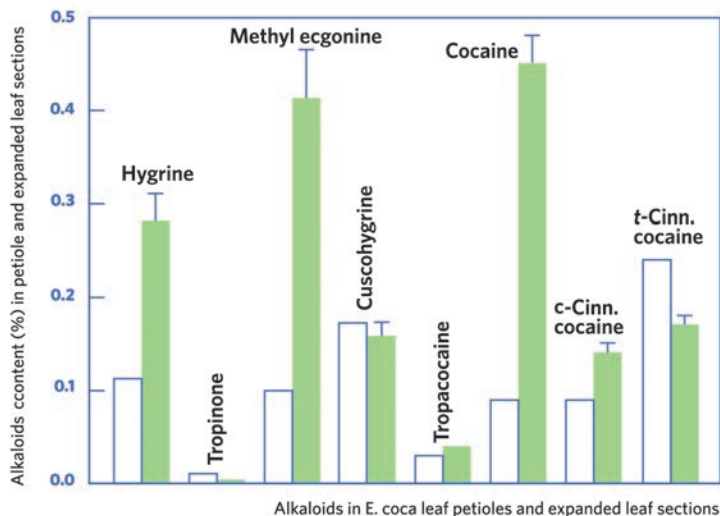


Gráfico 1-1: Concentración de alcaloides en el peciolo (barra blanca) y en la hoja (barra verde) de *E. Coca* (%). *Annals of Botany*, 1995. Emanuel L. Johnson.

5144821162543 Nro de Licencia

El análisis de los espectros de masa de los dos picos que encontramos en las muestras de orina de coqueros parecía corresponder a estos dos alcaloides: **higrina y cuscohigrina**.

El siguiente inconveniente con el que nos encontramos fue que **ninguno de los dos alcaloides higrina y cuscohigrina estaban disponibles comercialmente**.

No pudimos encontrar en la bibliografía que estos dos alcaloides fueran detectados en muestras de orinas de consumidores de cocaína y tampoco hallamos que hubieran sido reportados en los análisis de las muestras de secuestro o alijo.

🔍 ¿Sería que no eran informados porque no estaban publicados en las dos bibliotecas comerciales de uso más frecuente en los laboratorios de toxicología y además porque no existían testigos comerciales?

Decidimos hacer una primera investigación empleando orina de al-

gunos voluntarios que mascaron hojas de coca, orinas de consumidores de cocaína de España (20), Italia (5) y Argentina (5) y analizando muestras de alijo (30). Los resultados fueron muy prometedores. No fue sencillo conseguir la publicación de estos resultados preliminares que serían finalmente aceptados por Forensic Science Internacional, costó su publicación precisamente por la falta de testigos indubitables de higrina y cuscohigrina, se empleó la hoja de coca como fuente de cuscohigrina e higrina, el índice de retención de Kovats, y el análisis de los espectros de masa para la identificación, pero **algunos revisores no lo consideraron suficiente porque exigían el uso de testigos indubitables por eso fue rechazado por algún Journal.**

Las primera publicación y poster:



Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing[☆]

C. Rubio^a, S. Strano-Rossi^b, M.J. Tabernero^c, L. Anzillotti^b, M. Chiarotti^b, A.M. Bermejo^{c,*}

^aForensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Patagonia, Argentina

^bInstitute of Legal Medicine, Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italy

^cInstitute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing- Forensic Science International—Rubio N.C.; Strano-Rossi S.; Tabernero M.S.; Anzillotti L.; Chiarotti M.; Bermejo A.M. Forensic Science Internacional 227 (2013) 60-63



POSTER-Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing- Congreso Internacional de Toxicología Forense -TIAFT-Hamamatsu-Japón—junio-2012-Rubio N.C; Strano-Rossi S.; Tabernero MS; Anzillotti L.; Chiarotti M.; Bermejo AM.

Seguimos con las preguntas y dificultades- Algunas que debían ser respondidas en el laboratorio y otras de la lectura y revisión bibliográfica.

🔍 **Necesitábamos los testigos indubitables de higrina y cuscohygrina.**

Se debió solicitar a las casas comerciales en Italia y Canadá su síntesis. La cuscohygrina sería sintetizada en LG-Milán Italia y en Toronto Research Chemicals, Inc., (North York, Canada). La higrina nunca pudimos conseguirla como patrón y todos los ensayos se realizaron

teniendo en cuenta su identificación a partir de las hojas de coca.

🔍 **El número de muestras analizadas no era suficiente y provenía de voluntarios.**

Necesitábamos una población real de masticadores de hojas de coca, la zona del noroeste argentino era la ideal y de la provincia de Salta provendrían nuestras muestras de orina y pelo.

Y quedaba la sospecha (difícil) pero había que resolverlo **si nuestros consumidores de cocaína no tendrían también el hábito de mascar hojas de coca.**

🔍 **Debíamos buscar una población fuera de América Latina, 29 muestras de orina de consumidores de cocaína de España fueron seleccionadas para su análisis.**

Así publicamos los siguientes trabajos, más sólidos desde el punto de vista científico. Los marcadores de masticado hygrina y cuscohygrina parecían ser útiles.



Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases[✉]



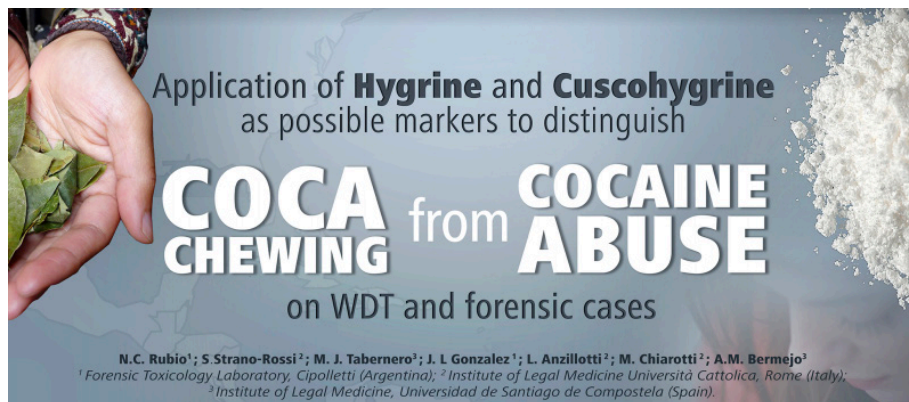
N.C. Rubio^{a,*}, S. Strano-Rossi^b, M.J. Tabernero^c, J.L. Gonzalez^a, L. Anzillotti^b, M. Chiarotti^b, A.M. Bermejo^c

^a Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Argentina

^b Institute of Legal Medicine Università Cattolica, Rome, Italy

^c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. Rubio N.C.; Strano-Rossi S.; Tabernero MS; Gonzalez J.; Anzillotti L.; Chiarotti M.; Bermejo AM. Forensic Science Internacional 7523-DOI10.1016/j.forsciint.2014.02.024.



POSTER-Application of hygrine and cuscohygrine as posible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. Congreso Internacional de Toxicología Forense -TIAFT-Funchal-Madeira-Portugal—septiembre-2013-Rubio N.C; Strano-Rossi S.; Tabernero MS; Gonzalez J.; Anzillotti L.; Chiarotti M.; Bermejo AM.



POSTER PREMIADO-Determinación en orina por UHPLC-MS/MS de dos nuevos marcadores para diferenciar el mascador de hojas de coca del consumidor de cocaína- TIAFT- 9 no Congreso Regional Latinoamericano – 4 al 8 de noviembre de 2013- Uruguay-Montevideo- Rubio N.C; Strano-Rossi S.; Tabernero MS; Gonzalez J.; Anzillotti L.; Chiarotti M.; Bermejo AM.



Detection of coca alkaloids in coca leaves and urine samples to proof the consumption of natural coca products

Franziska Krumbiegel¹, Eric Zytowski², Sven Hartwig¹, Cristina Rubio³, Fritz Pragst¹

¹ Charité - Universitätsmedizin, Institut für Rechtsmedizin, Berlin

² Landesinstitut für gerichtliche und soziale Medizin, Berlin

³ Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina

POSTER-Detection of coca alkaloids in coca leaves and urine samples to proof the consumption of natural coca products. Franziska Krumbiegel, Eric Zytowski, Sven Hartwig, Cristina Rubio, Fritz Pragst. XXI. Symposium der GTFCh, 11 - 13. April 2019 in Mosbach-Baden_Alemania.

1.5 Comportamiento de la higrina y la cuscohigrina en el proceso de extracción de las hojas de coca para la obtención de clorhidrato de cocaína.

Una pregunta que nos hacíamos era **¿en qué etapa de la producción ilegal de cocaína se perdía la higrina y cuscohigrina? ¿Qué protocolo se sigue para obtener cocaína?** Era lógico que siendo una producción ilegal no encontráramos un protocolo avalado internacionalmente. **Naciones Unidas y Casals y col mencionan una vía alcalina o por solvente y otra ácida para la producción de cocaína.**

Probamos extraer cocaína de las hojas de coca siguiendo ambos procedimientos y midiendo sus componentes en las distintas etapas y nuestros resultados fueron publicados en:

Short communication

Received: 2 January 2016

Revised: 18 February 2016

Accepted: 18 February 2016

Published online in Wiley Online Library

(www.drugtestinganalysis.com) DOI 10.1002/dta.1972

Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse

Nelida Cristina Rubio,^a Denise Thurmann,^b Franziska Krumbiegel^b and Fritz Pragst^{b*}

Hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) are natural alkaloids of coca leaves but are not found in illicit cocaine seizures. Therefore, they were proposed as markers for coca chewing in contrast to cocaine abuse in urine and hair testing. In order to examine at which step of the illegal cocaine production these compounds are lost, coca leaves were processed according to an authentic procedure by extraction with lime and kerosene, re-extraction with sulphuric acid, and precipitation of coca paste with ammonia. Non-extracted and extracted coca leaves, acidic extract and coca paste were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for cocaine, ecgonine methyl ester (EME), cinnamoylcocaine (CIN), HYG, and CUS. It follows from the results that under these conditions, HYG and CUS are extracted only to a minor extent by kerosene and are not precipitated from the acidic re-extract in the coca paste. Due to this behaviour in illegal cocaine production, they fulfil the conditions as markers for coca chewing in an optimal way. However, for unambiguous discrimination between coca chewing and cocaine abuse in human samples, additional markers of manufactured cocaine are required. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: coca chewing; cuscohygrine; hygrine; illegal cocaine production; markers

Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast to cocaine abuse. Nelida Cristina Rubio, Denise Thurmann, Franziska Krumbiegel and Fritz Pragst. Drug Testing and Analysis. Drug Test. Analysis (2016). (www.drugtestinganalysis.com) DOI 10.1002/dta.1972.

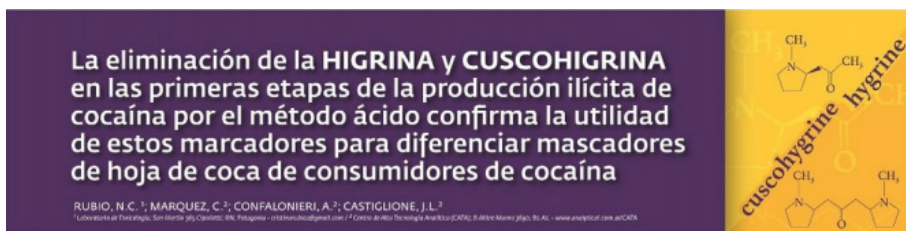
Behavior of HYGRINE and CUSCOHYGRINE in illicit cocaine production establishes their use as markers for discrimination between chewing of coca leaves and cocaine abuse

N. C. RUBIO¹, F. KRUMBIEGEL², D. THURMANN¹, F. PRAGST²

¹Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Patagonia, Argentina; ²Institute of Legal Medicine, University Medicine Charité, Berlin, Germany

cuscohygrine hygrine

POSTER-Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast to cocaine abuse. Nelida Cristina Rubio, Denise Thurmann, Franziska Krumbiegel and Fritz Pragst. TIAFT.Firenza-2015



POSTER-La eliminación de la higrina y cuscohygrina en las las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascaradores de hoja de coca de consumidores de cocaína. Rubio N.C.; Marquez, C.; Confalonieri A.; Castiglione J.L. TIAFT- PERU- noviembre 2015.

1.6 Higrina y cuscohygrina en pelo.

Siendo un trabajo de investigación que pretendía dar solución al mundo judicial y laboral las lógicas preguntas iban a ser:

🔍 **¿La higrina y cuscohygrina se incorporarían al pelo como otras drogas?, ¿Se podría a través del pelo establecerse un consumo crónico de hojas de coca?**

Nuevamente necesitábamos una población mascadora de hojas de coca , recurrimos a mascaradores del noroeste argentino y una población consumidora de cocaína que la obtuvimos de Alemania.

Los resultados obtenidos se publicaron y presentaron en:

Int J Legal Med
DOI 10.1007/s00414-014-1061-6

ORIGINAL ARTICLE

Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios

Nelida Cristina Rubio · Martin Hastedt ·
Jorge Gonzalez · Fritz Pragst

Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. Nelida Cristina Rubio, Martin

Hastedt, Jorge Gonzalez and Fritz Pragst- International Journal of Legal Medicine-20 august 2014-DOI 10.1007/s00414-014-1061-



POSTER-Can the use of alkaline substance during chewing coca leaves change the distribution of alkaloids of cocaine in hair? TIAFT 52ND Annual Meeting of the international Association of Forensic Toxicologists-Buenos Aires 9-13 noviembre de 2014.

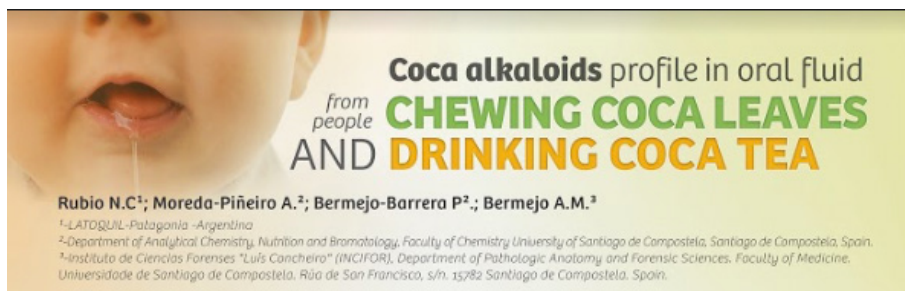
PRESENTACION ORAL Dr. F. Pragst.- Discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis. Nélica Cristina Rubio, Martin Hastedt, Jorge Gonzalez, and Fritz Pragst- Analytical clinical and forensic toxicology meeting- Bordeaux-Francia-11-13 de junio 2014.

1.7 Higrina y cuscohigrina en fluido oral.

🔍 ¿Cómo se comportarían la higrina y la cuscohigrina en el fluido oral?

Este debía ser un dato importante porque siendo una práctica tan extendida en Argentina no sería infrecuente hallar resultados positivos a cocaína, pero no por consumo sino por mascado o beber té de coca en los controles de tránsito. En Argentina hasta el momento de escribirse esta tesis no era habitual el uso del fluido oral, nos adelantamos a lo que será un problema cercano.

Nuestros preliminares resultados se presentaron en:



POSTER- Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Rubio N.C; Moreda-Piñeiro A.; Bermejo-Barrera P.; Bermejo A.M. TIAFT 2018- 26-30 de agosto 2018 en Ghent Bélgica.

Journal of Analytical Toxicology, 2018;1–7
doi: 10.1093/jat/bky076
Article



Article

Development of a Reliable Method for Assessing Coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC–MS–MS

Nelida Cristina Rubio^{1,2,*}, Pilar Bermejo-Barrera², Ana Maria Bermejo³, and Antonio Moreda-Piñeiro²

¹San Martín 565 Cipolletti AR, Latoquil, ²Universidade de Santiago de Compostela, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, Santiago de Compostela, ES 15782, Spain, and ³Universidade de Santiago de Compostela, Department of Pathologic Anatomy and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, Rúa de San Francisco, s/n. 15782 Santiago de Compostela, Spain

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: cristinarubio2@gmail.com

Development of a Reliable Method for Assessing Coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC–MS–MS. Nelida Cristina Rubio, Pilar Bermejo-Barrera, Ana Maria Bermejo, Antonio Moreda-Piñeiro. Journal of Analytical Toxicology, 2018;1–7 doi: 10.1093/jat/bky076.

COMUNICACIONES BREVES

Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascarador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Preliminary study

Rubio, Nélida Cristina¹; Moreda-Piñeiro A.²; Bermejo-Barrera P.²; Bermejo A.M.³

¹Laboratorio de Toxicología y Química Legal (LATOQUIL), Cipolletti, Río Negro, Patagonia, Argentina. ²Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela -España. ³Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" (INCIFOR), Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, Rúa de San Francisco, s/n.15782, Santiago de Compostela - España.
*cristinarubio2@gmail.com

Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascarador de hoja de coca y un bebedor de té de coca- Estudio preliminar. Rubio N.C.; Moreda-Piñeiro A.; Bermejo-Barrera P.; Bermejo A.M. Asociación Toxicológica Argentina 2019.

1.8 Estabilidad de la higrina y cuscohigrina en la orina.

La orina había mostrado ser una matriz útil para establecer que una persona ha mascado hojas de coca, en el mundo forense no es infrecuente solicitar una revisión de los resultados a pedido de alguna de las partes que intervienen en el proceso judicial, ¿cómo sería entonces la estabilidad de la higrina y cuscohigrina en las muestras de orina? ¿Sería factible pasado algunos años rehacer el análisis en orina con resultados similares?

Microchemical Journal 151 (2019) 104215



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc



The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years



N.C. Rubio^{a,b,*}, A. Moreda-Piñeiro^b, I. Álvarez-Freire^c, P. Bermejo-Barrera^b, M.J. Taberero-Duque^c, A.M. Bermejo^c

^aToxicology Laboratory, San Martín 565, Cipolletti, RN, Patagonia, Argentina

^bDepartment of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

^cForensic Sciences Institute "Luis Concheiro" (INCIFOR), Department of Pathologic Anatomy and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, Rúa de San Francisco, s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years. N.C. Rubio, A. Moreda-Piñeiro, I. Álvarez-Freire, P. Bermejo-Barrera, M.J.

Tabernero-Duque, A.M. Bermejo. *Microchemical Journal* 151 (2019) 104215.



Rubio N.C.1,2; Moreda-Piñeiro A.2; Álvarez-Freire I. 3; Bermejo-Barrera P.2; Tabernero-Duque M.J. 3; S. Strano-Rossì4; Bermejo A.M.3
¹ Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina ² Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela Spain. ³ Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" (INCIFOR Forensic Toxicology Service, Forensic Sciences Institute, Medicine School, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. ⁴ Institute of Legal Medicine, Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italy.

POSTER- The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years. TIAFT. N.C. Rubio, A. Moreda-Piñeiro, I. Álvarez-Freire, P. Bermejo-Barrera, M.J. Tabernero-Duque, A.M. Bermejo. Septiembre 2019- Birmingham -Inglaterra.

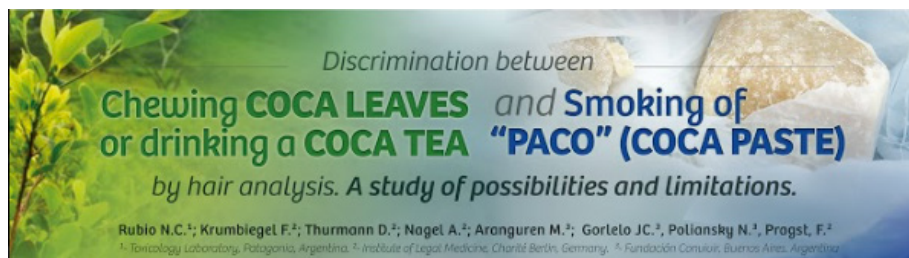
1.9 Comportamiento de la higrina y cuscohigrina en el pelo de fumadores de “PACO” de la Argentina y en mascadores de hojas de coca y tomadores de té de coca ocasionales. La anhidroecgonina metil éster (AEME) un marcador de fumado de cocaína base a considerar en los consumidores de hoja de coca.

🔍 En la Argentina el consumo de “Paco” es una práctica de fumado de cocaína, se da en las clases en general de bajos recursos económicos y es pasta de coca o coca base, un paso previo a la producción del clorhidrato de cocaína. **¿La higrina y cuscohigrina serían en estos casos marcadores útiles para diferenciar el fumado de pasta base del masado de cocaína?** La manufactura de pasta base se hace en laboratorios clandestinos y es de esperar variaciones entre lote y lote de producción. **¿Cómo se comporta el marcador de fumado de cocaína: AEME en estos casos?**

🔍 Nuestros estudios en muestras de pelo se habían realizado sobre una población de mascadores frecuentes de hoja de coca del noroeste argentino, en donde la práctica está bien extendida, pero **¿qué pasa con aquellos que mascan esporádicamente hojas de coca y quien bebe un té**

de coca de tanto en tanto, el pelo tendría la misma efectividad?

La respuesta parcial a estos dos interrogantes lo presentamos en la publicación y poster siguiente:



POSTER- Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of “paco” (coca paste) by hair analysis. A study about possibilities and limitations. Rubio NC.; Krumbiegel F.; Thurmann D., Nagel A.2; Aranguren M.; Gorlelo JC.; Poliansky N.3; Pragst, F. TIAFT 2018- 26-30 de agosto 2018 en Ghent Bélgica-



Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of “paco” (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations

N.C. Rubio^a, F. Krumbiegel^b, F. Pragst^{b,*}, D. Thurmann^b, A. Nagel^b, E. Zytowski^b, M. Aranguren^c, J.C. Gorlelo^c, N. Poliansky^c

^aToxicology Laboratory, Patagonia, Argentina
^bInstitute of Legal Medicine, Charité Berlin, Germany
^cFundación Convenir, Buenos Aires, Argentina

Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of “paco” (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations. N.C. Rubio, F. Krumbiegel, F. Pragst, D. Thurmann, A. Nagel, E. Zytowski, M. Aranguren, J.C. Gorlelo, N. Poliansky. Forensic Science International 297 (2019) 171–176. PAPER

1.10 Perfil en plasma de cocaína, benzoilecgonina y cuscohigrina de un mascarador de hojas de coca.

🔍 Otro punto importante de conocer era ¿Cómo sería el perfil en plasma de la concentración de cuscohigrina durante y luego de terminar de mascar hojas de coca?, y los niveles de cocaína y benzoilecgonina?



POSTER- Cocaine, benzoylecgonine and cuscohygrine profile in plasma from a volunteer who chews coca leaves. Preliminar study. Rubio N.C.; Moreda-Piñeiro A.; Álvarez-Freire I.; Bermejo-Barrera P.; Tabernero-Duque M.J.; Bermejo A.M. TIAFT. Septiembre 2019- Birmingham -Inglaterra.

Detection window of cocaine, benzoylecgonine, and cuscohygrine in plasma and urine of a chewer of coca leaves by GCMS and immunoassay COBAS 400- Preliminary results.

Rubio N.C.1,2,3; Moreda-Piñeiro A.2; Álvarez-Freire I. 3; Cabarcos P. 3; Bermejo-Barrera P.2; Tabernero-Duque M.J. 3; Bermejo A.M.3.

(PARA ENVIAR A REVISION)

1 Toxicology Laboratory. Patagonia. Argentina.

2 Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela Spain.

3 Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" (INCIFOR Forensic Toxicology Service, Forensic Sciences Institute, Medicine School, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

Detection window of cocaine, benzoylecgonine, and cuscohygrine in plasma and urine of a chewer of coca leaves by GCMS and immunoassay COBAS 400- Preliminary results. Rubio N.C.; Moreda-Piñeiro A.; Álvarez-Freire I.; Cabarcos P.; Bermejo-Barrera P.; Tabernero-Duque M.J.; Bermejo A.M. (Para enviar a revisión))

El soporte teórico es imprescindible en todo proyecto de investigación, fue dando lugar a nuevos interrogantes como a sustentar los resultados que íbamos obteniendo.

🔍 **Teníamos que conocer sobre la botánica de la planta de coca, ¿hay diferentes especies? ¿Todas las hojas que se consumen son iguales? ¿Cualquier planta del género *Erythroxylum* tiene cocaína, higrina y cuscohigrina? ¿Qué plantas de *Erythroxylum* se consumen? ¿Podíamos extrapolar los resultados obtenidos a todos los mascadores? ¿Era de esperar resultados similares en un mascador de hojas de Colombia, Perú, Bolivia, Chile o Argentina?**

Las respuestas están dadas en el capítulo **LA PLANTA DE COCA.**

🔍 **La química de la hoja de coca fue otro de los temas a investigar, ¿qué relación hay entre los alcaloides higrina, cuscohigrina y cocaína?, ¿la síntesis de estos alcaloides es independiente?, ¿puede existir la posibilidad que haya hojas de coca que tengan cocaína y no higrina y cuscohigrina?, en ese caso la utilidad de la higrina y cuscohigrina como marcadores de consumo de hojas de coca serían de limitada utilidad.**

La química de la hoja de coca fue otro de los temas de investigación que quedan resumidos en el Capítulo **LA QUÍMICA DE LA HOJA DE COCA.**

🔍 **No podemos de dejar de dedicarle un capítulo de esta tesis a las técnicas y procedimientos analíticos empleados. Higrina y Cuscohigrina son alcaloides que tiene algunas diferencias químicas con respecto a los otros alcaloides corrientemente investigados del grupo de los alcaloides del tropano como cocaína, benzoilecgonina, metilecgonina, cinnaoilcocaína que nos obligó al empleo de técnicas de separación menos específicas y columnas cromatográficas de mayor polaridad. Discutiremos las técnicas empleadas sus características, fundamentos, debilidades y la necesidad de su mejoramiento en especial de las técnicas extractivas. Se discutirá brevemente la importancia en el campo forense de las diferentes muestras biológicas empleadas.**

El Capítulo: **TIPO DE MUESTRAS-PREPARACION DE MUESTRAS-TECNICAS INSTRUMENTALES**, abordará estos temas.

El Capítulo: **TRABAJOS PRESENTADOS - DISCUSIÓN** contendrá los paperes y pósteres presentados y un pequeño comentario de los aspectos que se consideran más importantes del estudio y las conclusiones.

Para cerrar la tesis el Capítulo de **CONCLUSIONES Y PROPUESTAS**.

En las conclusiones y propuestas trataremos de sintetizar humildemente no solo los nuevos conocimientos que hemos podido aportar en esta área, sino también de las nuevas puertas que se han abierto para futuras investigaciones, porque la tesis es la entrega de un trabajo pero no la culminación del estudio.

Creemos que nuestro mayor aporte es haber sacado del estancamiento un tema que no había sido casi abordado y que constituye un problema real para el sistema de Justicia y el ámbito laboral al menos de la Argentina, que solo alcanza a esbozar respuestas a media, posponer controles de drogas o dar respuestas para saltar la coyuntura pero que no son el resultado de un sólido análisis científico.

Durante el desarrollo de esta tesis fui invitada a:

- Exponer los avances de esta investigación en forma oral como disertante en III Congreso Iberoamericano de Salud Ambiental para el Desarrollo Sustentable. 24 al 27 de septiembre de 2014 –Comodoro Rivadavia-Chubut-Patagonia:

Higrina y cuscohigrina: posibles marcadores para diferenciar consumidores de cocaína de mascadores de hoja de coca. Congreso Iberoamericano de Toxicología-.

- Y a presentar un artículo en la revista INVESTIGACIÓN Y CIENCIA:

AVANCES EN LA DIFERENCIACIÓN DEL CONSUMO TRADICIONAL DE LA HOJA DE COCA DEL CONSUMO ILÍCITO DE COCAÍNA

Palabras clave: Higrina y cuscohigrina, mascaradores de hoja de coca, marcadores cocaína.
Key words: Higrine and cuscohigrine, coca chewing, cocaine markers, cocaine abuse.

En la Argentina la práctica de “mascar” hojas de coca o “coquear” no está prohibida y es ampliamente difundida no sólo en la población indígena de nuestro país sino que su uso ha alcanzado todos los niveles sociales. La diferenciación del uso ancestral de la hoja de coca del consumo ilegal de cocaína resulta fundamental para el ámbito forense y laboral. En esta publicación se hace una reseña de los trabajos de investigación que se están desarrollando en orina y pelo y de la propuesta de dos alcaloides de la hoja de coca: higrina y cuscohigrina para diferenciar los mascaradores de hoja de coca de los consumidores de cocaína.

In Argentina the practice of chewing coca leaves or “coquear” is not prohibited and it is widespread not only among the indigenous population of our country, its use has reached all levels of society. The differentiation of ancestral use of coca leaf of cocaine abuse is essential for workplace drug and forensic. This publication presents an overview of the research being carried out in urine and hair, the proposed of two alkaloids of coca leaf is made.

■ **Nélida Cristina Rubio**

Laboratorio de Toxicología, Cipolletti, Río Negro.

E-mail: cristinarubio2@gmail.com

Avances en la diferenciación del consumo tradicional de la hoja de coca del consumo ilícito de cocaína. 2016. ARTÍCULO.

2.

INTRODUCCIÓN - BREVE RECORRIDO HISTÓRICO DE LA COCA Y COCAINA - LA POSICIÓN DE NACIONES UNIDAS - IMPORTANCIA DEL TEMA DE ESTA TESIS - RAZONES DE SU ELECCIÓN

“Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido.
Ahora es el momento de comprender más,
para que podamos temer menos.”

Marie Curie

2.1 Introducción y Breve recorrido histórico de la planta de coca.

EL nombre coca proviene de una palabra de origen Aymara que significa “alimento para trabajadores y viajeros” o término genérico que se emplea indistintamente para planta o árbol.

Es una planta que forma parte de la identidad del mundo andino hoy como en el pasado. En la época prehispánica los Incas no celebraran ninguna ceremonia o ritual sin que la hoja de coca fuera ofrecida a los dioses, pero además era empleada con fines medicinales varios, como anestésico natural fue usada en cirugías como la trepanación de cráneos, en la que los médicos andinos hicieron grandes adelantos. (Rosaco y col 2011)

Ciro Alegría, escritor peruano, quién en su obra *El Mundo es ancho y Ajeno*, sintetiza en estas oraciones el valor de la coca para la población andina:

“La coca es buena para el hambre, para la sed, para la fatiga, para el calor, para el frío, para el dolor, para la alegría, para todo es buena. Es buena para la vida. A la coca preguntan los brujos y quién desea catipar; con la coca se obsequia a los cerros, lagunas y ríos encantados; con la coca viven los vivos, llevando coca entre las manos se van los muertos. La coca es sabia y benéfica”

El mascado de la hoja de coca también conocido como: mambear (Colombia); chacchar, acullicar, pijchear (Perú, Bolivia); coquear y mascar (general), es una práctica milenaria y ampliamente difundida en el pasado y que se ha proyectado en el presente con algunos matices como veremos en la Argentina. La arqueología ubica ya el consumo de la hoja de coca en el Suroeste de Ecuador por cerámicas de la cultura Valdivia (3000. a.C) que representan individuos con el acullico en la mejilla; en Perú se han encontrado vasijas similares de la cultura Mochica (500 d.C) con la mejilla dilatada por el acullico (**Imagen 2-1**). Recipientes destinados a contener la cal o **yista** o **llicta** (sustancia alcalina empleada en el coqueo), han sido descubiertos sobre la costa norte del Perú, en el sitio de HUACA PRIETA (2500 a 1800 años a.c.). Cabrera M.V. (1997); Santoni M.E y col.(2019)

Rastros del Imperio Incaico y del consumo de hojas de coca fueron también descubiertos en Argentina, los cuerpos momificados de tres niños, uno varón de siete años aproximadamente, una niña de seis y una joven de unos 13 o 15 años fueron hallados en la cima del segundo volcán activo más alto del mundo, el Llullaillaco a 6730 msnm en la provincia de Salta (Noroeste argentino (NOA)). Los Incas preparaban a los niños para el sacrificio durante meses dándoles alcohol y hojas de coca según estudios realizados en el pelo (los hallazgos de cocaína,



Imagen 2-1: Vasija cultura Mochica (500 d.C). Fuente: Luis García

GFDL & Cc-by-sa-3.0,2.5,2.0,1.0 licenses.

benzoilecgonina y cocaetileno en varios centímetros de pelo son indicativos de una preparación de meses de estos niños para el sacrificio), los niños eran conducidos al volcán en una larga caminata de 3000 km desde Cuzco (Perú) hasta la cumbre del volcán Llullaillaco (Argentina), la muerte se producía rápidamente por hipotermia. Los “NIÑOS DEL LLULLAILLACO” (**Imagen 2-2**) como se los conoce son considerados las momias prehispánicas mejor conservadas del mundo y halladas en el santuario (Inca) más alto del mundo en 1999.



Imagen 2-2: “La doncella”- NIÑOS DEL LLULLAILLACO (500-550 años de antigüedad). Museo de Arqueología de Alta Montaña de Salta. (NOA)

Licencia: CC BY 2.0 (<https://www.flickr.com/photos/11656539>)

Los sacrificios humanos de los incas, en donde la coca tenía su protagonismo, fueron documentados en diferentes ocasiones por los cronistas españoles, se hacían en el marco de la **Capacocha**, una serie de fiestas y ofrendas de agradecimiento que se realizaban en tiempos de cosecha y para apaciguar la montaña, el Llullaillaco es un volcán activo. En la **Imagen 2-3** se observa con el empleo de un método moderno restos del acullico en una de las momias. (Wilson y col. 2013)

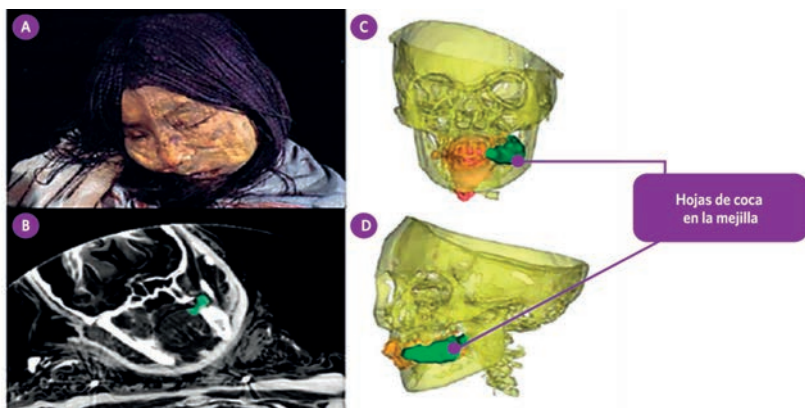


Imagen 2-3: NIÑA DEL LLULLAILLACO con restos de acullico en su boca.

Wilsona, A.S et al. PNAS, August 13, 2013, vol. 110, no. 33.

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1305117110. Permission is not required to use original figures or tables for noncommercial and educational use

Pero la paz de la coca iba a ser por primera vez interrumpida con la llegada del conquistador español y con ellos del cristianismo. El español intentó prohibir el uso de la coca por los indígenas argumentando que: *“era una costumbre diabólica ligada a la idolatría, que era la principal enemiga de la expansión del cristianismo”*.

Sin embargo, los indígenas de los Andes evangelizados por los conquistadores no dejaron de masticar la coca y supieron adaptar el mito original a las exigencias de la nueva religión: (La hoja de coca para el Perú_blog_ 2011)

“Tras el nacimiento de nuestro Señor Jesucristo -dice la versión cristianizada-, los diablos intentaron quitarle la vida. Cuando María, su madre, volvió a casa y no encontró a su hijo, se puso a buscarlo. Recorrió un largo trayecto sobre su asno, y se quedó muy debilitada por el hambre. Cristo la vio en ese estado y le bendijo un matorral de coca salvaje. María adivinó que su hijo había bendecido el arbusto para ella: comió algunas hojas y ya no sintió ni hambre ni fatiga”. Generosamente, María ofreció la planta a su pueblo.” Y de esta manera los indios del altiplano siguieron tomando la coca.

Pero la realidad es que el consumo de las hojas de coca no solo no

se prohibió, sino que se incrementó y pasó a ser el cultivo agrícola más significativo en el Perú durante la época de la conquista, esto fue debido a que los españoles vieron que el mascado de hojas de coca le permitía a los indígenas trabajar varios días sin comer ni beber, lo que traía gran beneficio para la explotación de sus minas como la de plata de Potosí, en las que eran sometidos los indígenas para trabajar. Esto se prolongó durante los siglos XVI, XVII, XVIII.

Pedro de Cieza de León, en 1553, relata que:

“En el Perú se utiliza la coca en la boca desde la mañana hasta la noche y preguntando a algunos indios ¿Por qué tienen siempre la boca ocupada por esta hoja? Ellos dijeron: porque sientes poca hambre y gran vigor y fuerza”.

Además, la coca pasó a generar a los españoles fabulosos ingresos y a ser una moneda comercial de intercambio. Los impuestos que se pagaban al Rey de España al igual que el diezmo que los nativos debían pagar a la Iglesia podían ser pagados en gran parte por hojas de coca.

Pero el conquistador español y la Iglesia no fueron ajenos a su consumo, el mascado de la hoja de coca les fue necesario para hacer frente a las duras situaciones de la conquista y a consecuencia del mestizaje. El Clero también se dio cuenta que para acercarse a los originarios debía aprender su lengua y practicar sus costumbres, esto les costó sufrir castigos por la inquisición española. (Rosasco, C. Ch y col 2011).

La coca sobrevivió a esta etapa y continuó siendo un marcador de identidad del mundo andino, pero no sin grandes penurias para el pueblo indígena. **Una leyenda inca sintetiza los padecimientos de su gente durante la conquista y su maldición:**

“Cuenta la leyenda que durante el reinado del Inca Atahualpa, el sumo sacerdote y el depositario del tesoro del templo del Sol, en la isla de Titicaca, era un viejo sabio y adivino llamado Khana Chuyma.

Por aquel tiempo llegaron a estas tierras los conquistadores españoles, ávidos de oro, quienes sometieron indios, profanaron dioses y saquearon templos. Resuelto a impedir que el oro sagrado del Sol caiga en manos del invasor, Khana Chuyma lo escondió en un lugar secreto a

orillas del Lago, y diariamente subía a una altura para escudriñar si se aproximaban las huestes de Pizarro. Un día las vio venir a lo lejos. Sin perder un instante, arrojó todo el tesoro a lo más profundo de las aguas.

Enterados de lo ocurrido, los españoles prendieron al viejo sacerdote para arrancarle a viva fuerza el secreto de las riquezas perdidas. Khana Chuyma soportó estoicamente los más crueles tormentos, sin que una sola palabra saliera de sus labios. Cansados sus verdugos de torturarlo inútilmente, lo dejaron moribundo en un campo.

En medio de su dolorosa agonía, esa noche Khana Chuyma tuvo una visión: el Dios Sol se le apareció resplandeciente tras una montaña y le habló así:

-Hijo mío, tu heroico sacrificio para salvar los objetos sagrados merece recompensa. Pídemelo que quieras, que te será otorgado.

-Oh dios amado, qué otra cosa puedo pedirte en esta hora de duelo y derrota sino la redención de mi raza y la expulsión de los invasores”, contestó Khana Chuyma.

-Lo que tú me pides, respondió el Sol, es ya imposible. De nada vale mi poder contra estos intrusos. Su dios me ha vencido y yo también debo huir a esconderme en el misterio del tiempo, pero antes de partir quiero concederte algo que está dentro de mis facultades, dijo el Inti.

-Ya que es imposible devolver la libertad a mi pueblo padre mío, alírnos te pido algo que lo ayude a soportar la esclavitud y las penurias que le esperan; algo que no sea oro, riqueza, para que la codicia del invasor no se lo debata. Te pido un consuelo secreto que dé a los míos la fuerza para sobrellevar los trabajos, los vejámenes y las humillaciones que sus opresores les impondrán.

-Concedido, dijo el Inti. **Mira a tu alrededor ¿ves esas plantas de hojas verdes y ovaladas que hice brotar? Di a los tuyos que las cultiven con todo cuidado y que sin lastimar sus tallos arranquen las hojas, y después de secarlas, las mastiquen.**

El Jugo de esas plantas será un bálsamo para sus sufrimientos. Al mascar las hojas, juntos compartirán todos ustedes momentos de confraternidad y alegría solidaria. En los duros trabajos que deberán acometer, esas hojas les quitarán la fatiga y les darán nuevos bríos.

En los largos viajes por las punas inclementes, la coca aliviará del hambre y del frío y les hará más llevadero el camino. En las minas, que sus nuevos amos les obligarán a laborar, no podrán soportar la fetidez, la oscuridad y el terror de los profundos socavones sino con la ayuda de la coca. Cuando deseen indagar en el futuro incierto, un puñado de esas hojas lanzado al azar les revelará los misterios del destino.

Pero estas hojas que para ustedes significan la salud, la fuerza y la vida, están malditas para los opresores. Cuando el hombre blanco se atreva a utilizarlas les sucederá todo lo contrario.

Su jugo, que será para el aborigen alimento divino, será para el hombre blanco el más repugnante y pervertido de todos los vicios. Esta planta sagrada es el legado que les dejó, cuiden que no se extinga y hagan buen uso de ella.”

Y la maldición se iba a cumplir..... la coca estaba por sufrir un nuevo golpe, otra vez sería censurada, pero se cobraría su revancha, esta vez las consecuencias las iba a pagar el “hombre blanco”.

En un breve punteo del recorrido de la cocaína desde su descubrimiento en la planta de coca hasta nuestros días, sin hacer mención a los graves daños a la salud pública que la cocaína origina tenemos: (Goldstein y col 2009)

- El descubrimiento de la cocaína es sin ninguna duda la razón más fuerte de la demonización de la coca. En la mitad de los años 1800 un estudiante de doctorado alemán Albert Niemann aísla el alcaloide cocaína de las hojas de coca y nota sus propiedades anestésicas y ya a fines del 1800 la cocaína era empleada por estas propiedades.

- En 1863 la cocaína fue mezclada con alcohol por Angelo Mariani y dio origen al Vino Mariani muy aceptado por los primeros ministros, la realeza y el Papa. El cocaetileno que se formaba reforzaba la potencia del etanol.

- En 1886 John Styth Pemberton introduce la cocaína en la Coca-Cola, que fue vendida como una medicina hasta 1903 año en el que la cocaína fue removida de la Coca-Cola.

- En 1879 la cocaína fue usada para tratar la adicción de la morfina.

- En 1885 Parke-Davis vendía cocaína en diferentes formas: polvos, cigarrillos e inyectables.

- Hasta 1916 se vendió en forma libre en USA en tónico, medicinas, para calmar el dolor de muelas y en tabletas de chocolate.

- Sigmund Freud, el padre del psicoanálisis, tuvo un importante rol en el desarrollo de la industria de la cocaína en occidente. Freud tomaba pequeñas dosis de cocaína diaria que le ayudaban como él decía a levantar el espíritu, a dejar de pensar en sus dificultades profesionales y financieras y contra la indigestión. Las industrias farmacéuticas Merck y Parke-Davis pagaron a Freud para que respaldara sus productos. Freud escribió varios documentos sobre la cocaína el más conocido es Umber (1884), donde habla de los efectos de la cocaína sobre sus pacientes.

- Iniciado el siglo XX ya se conocían las propiedades adictivas de la cocaína.

- En 1914 la Ley Harrison de narcóticos cobra un impuesto a quienes producen, importen, distribuyen, venden opio y hojas de coca.

- EN 1912 el gobierno de USA reportó 5000 muertos por la cocaína y en 1922 la droga **fue oficialmente prohibida**.

- El uso de la cocaína empezó a declinar en 1920 siendo en 1930 más notorio.

- Empiezan a aparecer informes como el de Naciones Unidas en 1950: "Report of the Commission of Enquiry on the Coca Leaf", mostrando una clara oposición a la planta de coca y su uso tradicional en el mundo andino, que finalizará con la firma de la Convención Única de estupefacientes de Naciones Unidas en 1961.

- En 1970 la cocaína surgió como la droga de artista y empresarios. Entre 1970 y 1980 aumentaron diez veces los estudiantes universitarios en USA que experimentaron con la cocaína.

- En 1980 la cocaína tenía ya la reputación de la droga más adictiva y peligrosa de USA también vinculada a la pobreza, crimen y muerte.

- En la década de 1990 se incrementó el contrabando de cocaína a USA, Europa y Asia desde Colombia.

- En el 2008 ya la cocaína **era la droga ilegal más traficada en el mundo**.

La cocaína que ingresa a los mercados del mundo para uso recreativo proviene de Sudamérica, esto ha provocado la condena a la planta de coca y en consecuencia ha sido desbastador para la economía y la política de algunos de los países latinoamericanos y por supuesto para la cultura del indígena andino. Todavía no se ha podido demostrar que mascar hojas de coca produzca los mismos efectos que el consumo recreativo de cocaína, aunque llamativamente son pocas las investigaciones que se han realizado en este campo (Plowman 1986).

2.2 La posición de Naciones Unidas. Convención Única de estupefacientes de Naciones Unidas 1961. Antecedentes y acciones posteriores.

La Convención Única de estupefacientes de Naciones Unidas firmada en 1961 pretendió restringir el cultivo de la hoja de coca y prohibir el mascado tradicional de la hoja de coca en los siguientes 25 años a la entrada en vigencia de la Convención de 1961, por considerarla una sustancia de abuso:

“Artículo 49-Reservas transitorias.

2e) La masticación de hoja de coca quedará prohibida dentro de los 25 años siguientes a la entrada en vigor de la presente Convención conforme a lo dispuesto en el inciso 1 del artículo 41.”



Claramente el objetivo principal era limitar la producción de materias primas para la producción de drogas; **clasificó a la hoja de coca en la Lista I, como una sustancia “susceptible de uso indebido”.**

La evidencia científica para prohibir el mascado de la hoja de coca que quedó plasmada en la Convención de 1961 vino de: (Meetal 2014)

■ Un informe ordenado por el Consejo Económico y Social (ECOSOC), publicado en 1950 como el Informe de la Comisión de Investigación sobre la Hoja de Coca el cual proscribía el mascado de la hoja de coca por sus efectos nocivos, este informe fue muy criticado por parcial.

■ La Comisión de Expertos de la OMS en Drogas Propensas a Producir Adicción discutió el tema en dos sesiones, en 1952 y 1954.

“mascar hojas de coca está cercano a las características de adicción...debe ser definido y tratado como una adicción”. WHO 1952.

“...Se señaló que existe una gran variación en la cantidad de cocaína ingerida por los masticadores de coca, al igual que existe entre las personas que toman alcaloides puros para fines no médicos. El término cocainismo es aplicable a este último y masticar coca (cocaísmo) debe considerarse una forma de cocainismo. (OMS 1954, p. 10).

En la década de 1980 países como Perú y Bolivia comenzaron a hacer sus reclamos desde el reconocimiento internacional de los derechos humanos e indígenas. En esta década la política persuasiva de USA y UE se había transformado en una política coercitiva en la que literalmente se le declaró la guerra a la planta de coca y trató de criminales a sus productores. Regiones productoras de coca en Colombia, Perú y Bolivia recibieron operaciones militares para erradicar el cultivo de la planta de coca, pero también del medio de vida de cientos de agricultores. Se diseñaron programas alternativos de cultivos para reemplazar al de la hoja de coca, pero fracasarían. No tardarían en surgir movimientos regionales de Bolivia y Perú defendiendo la hoja de coca.

En 1988 se negocia la **Convención contra el tráfico de estupefacientes y sustancias psicotrópicas**, que siguió con la línea dura sobre el cultivo de la coca, si bien en esta Convención se empezó a hablar del uso tradicional de la hoja de coca, pero la Convención deja en claro que todas las disposiciones previamente acordadas permanezcan intactas (Convención 1961), que el uso tradicional queda reservado al medicinal y científico. Bolivia hizo una reserva formal a la Convención de 1988, enfatizando que su “sistema legal reconoce la naturaleza ancestral del uso lícito de la hoja de coca que, para gran parte de la población de Bolivia, se remonta a siglos”. Perú y Colombia hicieron su reclamo también en esta Convención, pero no tan directamente al uso tradicional de la hoja de coca como Bolivia.

En la década de 1990 la **Junta Internacional de Control de Estupefacientes (JIFE)**, la entidad del organismo de control de drogas de la

ONU que supervisa y monitorea la implementación de los tratados de drogas de la ONU, señaló las contradicciones que acompañaron el tema de la coca en varias ocasiones en sus informes anuales y que estos distintos puntos de vista entre la Convención de 1961 y algunos de los países andinos debía resolverse.

La OMS realiza un estudio sobre la masticación de la hoja de coca en colaboración con el Instituto Internacional de Investigación de Crimen y Justicia de las Naciones Unidas (UNICRI) en los primeros años de la década de 1990. El Proyecto de Cocaína de la OMS / UNICRI realizado entre 1991 a 1995 subrayó que el uso tradicional de la coca parece no tener efectos negativos para la salud y que cumple funciones terapéuticas, sagradas y sociales positivas entre los grupos indígenas en la región andina. El 14 de marzo de 1995, la OMS anunció la publicación de la Iniciativa de Cocaína OMS / UNICRI a la prensa internacional. Poco después, el 9 de mayo de 1995, en la Comisión B de la 48ª Asamblea Mundial de la Salud en Ginebra, el representante de los Estados Unidos se mostró contrario a las conclusiones obtenidas en este estudio y amenazó a la OMS de suspender el apoyo financiero si la OMS formaba parte de este estudio. La OMS en consecuencia afirma que este estudio es responsabilidad de expertos internacionales pero que no reflejan la opinión del organismo. USA adopta la posición que el estudio debía ser revisado por pares de acuerdo a las directrices de la OMS lo que nunca se hizo y el estudio no se publicó.

En 2007, la **Declaración de las Naciones Unidas sobre los Derechos de los Pueblos Indígenas** establece que: *“los pueblos indígenas tienen derecho a mantener, controlar, proteger y desarrollar su patrimonio cultural, conocimiento tradicional y expresiones culturales tradicionales”* (ONU 2007, p. 11).

■ Bolivia en 2009 solicita una enmienda al artículo 49, párrafos 1 c) y 2 e) de la Convención Única sobre Estupefacientes de 1961, concretamente es eliminar la obligación de prohibir la masticación de la hoja de coca para permitir a los países donde hay evidencia de esta antigua tradición cultural y religiosa preservar su propia práctica cultural indígena milenaria; basado en que no causa ningún daño a la salud de las

personas ni ningún tipo de trastorno o adicción. (ONU 2012, p. 1). Estados Unidos, Reino Unido, Suecia, Canadá, Dinamarca, Alemania, la Federación Rusa, Japón, Singapur, Eslovaquia, Estonia, Francia, Italia, Bulgaria, Letonia, Malasia, México y Ucrania (un total de 18 países) notificaron formalmente al Secretario General de la ONU que no podían aceptar la enmienda propuesta por Bolivia, obviamente siguiendo directrices de Estados Unidos.

■ Ante el fracaso de Bolivia a esta primera iniciativa, Bolivia decide denunciar la Convención Única de 1961 en junio de 2011, y presentó su adhesión renovada al tratado, esta vez con una reserva formal, depositada en la ONU el 10 de enero de 2012, que dice:

El Estado Plurinacional de Bolivia se reserva el derecho de permitir en su territorio: masticación tradicional de hoja de coca; el consumo y uso de la hoja de coca en su estado natural con fines culturales y medicinales; su uso en infusiones; y también el cultivo, comercio y posesión de la hoja de coca en la medida necesaria para estos fines lícitos. El presidente de la JIFE hizo serios cuestionamientos a esta reserva sosteniendo que el sistema internacional de control se vería afectado si cada país miembro aceptaba los tratados con reservas. Al final, el 10 de enero de 2013 Bolivia volvió a ser aceptado en el tratado al igual que su reserva, solo 15 países presentaron una objeción formal a la entrada de Bolivia con esta reserva, pero no fueron suficientes. Esta pequeña victoria de Bolivia puede pensarse como un posible inicio para la reforma de la Convención de 1961.

2.3 La situación argentina del coqueo, un caso anómalo.

Argentina se presenta como un caso anómalo en la región en lo referente al uso de la hoja de coca. Como bien dice Ricardo Abduca y Pien Metaal (2013), en Argentina el uso de la hoja de coca es tradicional pero no solo circunscripto a los indígenas. Está arraigado, en la región noroeste (NOA) en todas las clases sociales incluso profesionales y empresarios y también entre sectores pobres. Se usa en ocasiones festivas y nocturnas, pre y pos comida y no está asociado a pesadas labores campesinas o mineras. Como bien lo definen algunos legisladores del

noroeste argentino el coqueo es un “hábito” y no un “vicio”.

Si bien el coqueo es hoy en día una práctica con nichos en toda la Argentina, es sin lugar a dudas el noroeste argentino (NOA) en donde su práctica es más intensa. Abduca (2013) describe al NOA como:

“Esta región, que antes de la conquista fue la más poblada de la actual Argentina, y que tuvo la primera y más intensa implantación española colonial, guarda varios rasgos de continuidad con el resto del mundo andino. Conoció la presencia del imperio inca y se difundió desde entonces la lengua quechua, que aún se habla en ciertos enclaves. La coca es uno de los atributos, quizás el más notable hoy día, de esos lazos históricos. La región es heterogénea, presentando más variedad social y cultural intrarregional que otras zonas del país. En particular, interesa aquí una subregión, la de las provincias de Salta y Jujuy, que hoy alberga a poco más de dos millones de habitantes; en el resto del NOA el consumo tiene menos intensidad. Hay también un intenso consumo en el oeste chaqueño, y se encuentran nichos de consumidores de coca en todo el país, principalmente entre la población migrante del NOA.” (Imagen 2-4)



Imagen 2-4: Mapa de la Argentina, en verde dos provincias del noroeste argentino (NOA) -Paisajes típicos del NOA.

En 1961 Argentina firma la Convención Única de Estupefacientes en cuyo artículo 49 se estipula la prohibición de la masticación de la hoja de coca, dentro de un plazo de 25 años siguientes a la entrada en vigor de la presente Convención, o sea que en el año 1986 no debía haber más coqueo en el territorio nacional argentino.

Tal vez porque el coqueo estaba arraigado en las clases medias o altas o bien como dice el escritor argentino José Fernández Díaz en: “El origen de la compleja identidad argentina” “nuestro país se había vuelto experto en dejar las cosas por la mitad”, lo cierto es que pasaron los 25 años y el año 1986 encontró a los argentinos aun coqueando.

En 1986 se empieza a discutir en la Argentina, una nueva ley nacional de estupefacientes en donde por supuesto el mascado de la hoja de coca estuvo presente. Los diputados del noroeste argentino hicieron fuertes ponencias en defensa de la legalidad de esta práctica argumentando:

..... “su uso ancestral y digestivo”, en el que está implícito para el que conoce la región la clara diferencia entre el uso ancestral de los indígenas y el digestivo de las clases urbanas que usan la hoja de coca en la sobremesa luego de la ingesta de abundantes comidas y bebidas.

..... algunos miembros del parlamento como el salteño J. Castiella hicieron la defensa del coqueo desde el lugar del consumidor y esto decía en una de las sesiones del Congreso Nacional en Buenos Aires:

“¿Cómo explicarle a aquel norteco que ha visto coquear a su padre, a su abuelo, que esa práctica constituye ahora un delito?... deseo manifestar públicamente en este recinto que el diputado que habla tiene el hábito del coqueo desde los veinte años... luego de esos veinte años, el diputado que habla... se graduó de abogado, fue dos veces diputado provincial, convencional constituyente y diputado nacional en dos oportunidades, se ha casado con el amor de su vida, tiene tres hermosos hijos, 47 años de edad, excelente salud y, si algún rasgo de idiotez se le puede encontrar por parte de algún científico de Buenos Aires, desde ya quedará agradecido a quien se lo pueda señalar. (Reunión 65ª, 7830-33)” Abduca y col. 2013.

Para ponernos en contexto debemos recordar que algunos revisio-

nistas e investigadores principalmente europeos marcaban el rasgo de “idiotez” y “desagradable” en la gente del mundo andino que mascaba hojas de coca.

Como mencionamos previamente Naciones Unidas presenta en 1950: “Report of the Commission of Enquiry on the Coca Leaf” con algunos comentarios parciales y de tinte racista y contrarios al mascado de la hoja de coca como el considerar esta práctica como la causante de la degeneración de la raza indígena.

Anterior a 1950 otros conquistadores como Américo Vespucio en 1504 decía:

“ Su rostro y sus gestos eran lo más desagradables que se puedan imaginar; todos ellos tenían las mejillas infladas por una hierba verde que ellos rumiaban como bestias, al punto que apenas podían hablar...”

2.4 Legislación Argentina de la hoja de coca.

En septiembre de 1989 el Parlamento argentino aprueba la **Ley 23737 (mod. Ley 26052 en 2005)** sobre estupefacientes que dice en su artículo 15:

“La tenencia y el consumo de hojas de coca en su estado natural, destinada a la práctica del coqueo o masticación, o a su empleo como infusión, no será considerada como tenencia o consumo de estupefacientes.”

El artículo 15 de la Ley 23.737 da lugar al menos a dos o tal vez tres situaciones complejas y absurdas para la Argentina:

1-El gobierno de Argentina no cumple con sus obligaciones internacionales al haber firmado la Convención Única de 1961 que prohibía el masticado de la hoja de coca, por lo que la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes JIFE señala en sus informes el incumplimiento de las obligaciones argentinas a este respecto.

2-Por otro lado, se legaliza la venta y la posesión para el consumo de la hoja de coca, pero la provisión y la compra por ejemplo a Bolivia, su principal proveedor, son ilegales, dando origen a un circuito ilegal de la hoja de coca.

...la tercera complicación de esta ley fue para los laboratorios...
lo que da origen a esta tesis doctoral.





Referencias

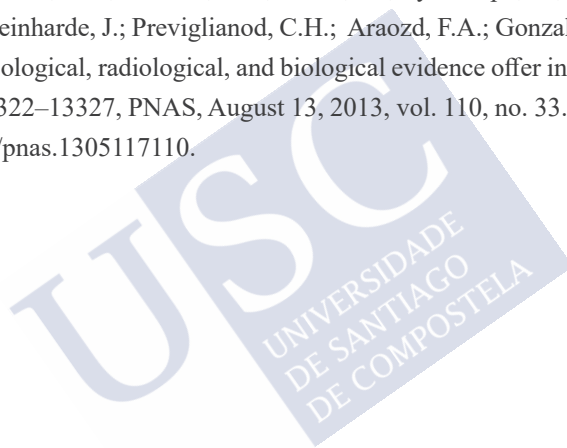
1. Abduca, R.; Metaal, P. Working towards a legal coca market: The case of coca leaf chewing in Argentina. Transnational institute. Series on Legislative Reform of Drug Policies No. 23 June 2013. https://www.tni.org/files/DLR_23_eng_def-1.pdf.
2. Alegría Ciro EL MUNDO ES ANCHO Y AJENO. pdf.
3. Biondich, A.S.; Joslin, J.D. Review Article Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. Hindawi Publishing Corporation, Emergency Medicine International , Volume 2016, Article ID 4048764, 5 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4048764>.
4. Brown, E.L. Investigating the use of coca and other psychoactive plants in Pre-Columbian mummies from Chile and Peru. An analytical investigation into the feasibility of testing ancient hair for drug compounds. Thesis. Archaeological Sciences, University of Bradford. 2012. <https://bradscholars.brad.ac.uk/handle/10454/5785>.
5. Cabrera, M.V.; Sauvain, M. Usos de la Hoja de coca y Salud Pública. INSTITUTO BOLIVIANO DE BIOLOGÍA DE ALTURA. Depósito legal: 4-1-227-97. marzo 1997-Libro
6. CONVENIO SOBRE SUSTANCIAS SICOTRÓPICAS DE 1971. Naciones Unidas. https://www.unodc.org/pdf/convention_1971_es.pdf. Dic 2019
7. Fernández-Díaz, J. Diario La Nación (Argentina). 08/12/2019. <https://www.lanacion.com.ar/sociedad/el-origen-de-la-compleja-identidad-del-ser-argentino-nid2311505>
8. Goldstein, R.A.; FACOI, C.D., Burda, A.; Johnson-Arbor, K. Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review. Seminars in Diagnostic Pathology (2009) 26, 10-17.
9. La hoja de coca para el Perú- Blog. <https://historiaenaccion3052.blogspot.com/2011/05/la-hoja-de-coca-para-el-peru.html>- diciembre 2019.
10. Metaal, P. Coca in Debate: The Contradiction and Conflict Between the UN Drug Conventions and the Real World. Chapte from book Controversies on the regulation of traditional drug use, 2014 (pp.25-44). DOI: 10.1007/978-3-642-40957-8_2.
11. Plowman, T. COCA CHEWING AND THE BOTANICAL ORIGINS OF COCA (ERYTHROXYLUM SPP.) IN SOUTH AMERICA in COCA AND COCAINE Effects on People and Policy in Latin Americ. Cultural Survival Report No. 23. June 1986
12. Rosasco, C.Ch.; Bardález Zambrano, G. Coca. La hoja sagrada de los Incas.

La verdadera Historia. Editorila Imprenta Lucero S.A.C. Cusco. Perú. Primera edición octubre 2011.

13. Santoni, M.E.; Torres, G. LA COCA (*Erythroxylum coca*). Masticando su historia. <http://www.portaldesalta.gov.ar/ANTROPO/coca.pdf>- diciembre 2019.

14. UNITED NATIONS Report of the Commission of Enquiry on the Coca Leaf May 1950. ECONOMIC AND SOCIAL COUNCIL OFFICIAL RECORDS FIFTH YEAR: TWELFTH SESSION SPECIAL SUPPLEMENT No. 1. https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1950-01-01_4_page005.html. Dic 2019

15. Wilsona, A.S.; Browna, E.L.; Villab, Ch.; Lynnerupb, N.; Healeyc, A.; Cerutid, M.C.; Reinharde, J.; Previglianod, C.H.; Araozd, F.A.; Gonzalez Diezd, J.; Taylora, T. Archaeological, radiological, and biological evidence offer insight into Inca child sacrifice. 13322–13327, PNAS, August 13, 2013, vol. 110, no. 33. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1305117110.





3.

LA PLANTA DE COCA

Ciro Alegría, escritor peruano, en su obra

El Mundo es ancho y Ajeno dice:

“Consentido era el arbusto”

“.....la coca, ahí donde se la veía, tan oronda, era una planta delicada. Se tenía que regarla de noche, pues de día las raíces sufrían con el agua calentada por el sol. A veces, el medidor, un gusano verde que se alimenta de las hojas, prosperaba mucho y entonces había que sahumar los árboles, también de noche, para que el gusano cayera al agua y se ahogara. Esos árboles no crecían allí por la fruta: la sombra era imprescindible para la coca. Por último, no duraba sino unos años, y por cualquier cosa se secaba. Había que estar resemebrando siempre... Sabía Dios qué secretos encerraba en su organismo ese delicado vegetal para extraer de las fuerzas oscuras de la vida, la sustancia que hacía de sus hojas las más preciadas por el hombre del Ande.”

3.1 INTRODUCCIÓN.

Siendo la hoja de coca la protagonista de nuestro estudio el objetivo de este capítulo será conocer sobre la botánica de la planta o arbusto de “coca”. Pero principalmente este capítulo tiene como objetivo no solo familiarizarnos botánicamente con la **Erythroxylum coca L** y la **Erythroxylum novogranatense** (D.Morris) Hieron, sino entender por qué estas dos especies, dentro de las 230 especies del género *Erythroxylum*, constituyen la planta sagrada del mundo incaico, son las que interesan por sus usos masticatorios, medicinales y por ser productoras de cocaína-

na y por qué los hallazgos de nuestra investigación que proponen dos alcaloides para diferenciar el consumo lícito del ilícito de cocaína puede ser extrapolado no solo a los masticadores de la Argentina sino de la región. Estas dos especies son plantas domésticas que requieren del cultivo del hombre, un arbusto “**consentido**” como lo define Ciro Alegría, que requiere de muchos cuidados y que no crece en forma silvestre, lo que explica las presiones internacionales para abandonar su cultivo, pero que choca con su uso ancestral y con el interés económico del narcotráfico internacional.

Se desarrollarán las teorías de las relaciones entre las **Erythroxylum coca L y la Erithroxylum novogranatense** y sus cuatro variedades y los eventos que condujeron a su domesticación que pertenecen entre otros a trabajos realizados por Plowman T. (1979 y 1984), Rury P.M. (1981), Bohem B.A y col. (1982), Johnson E.L. y col. (2005), Emche S.D. y col. (2011) y más recientemente a Melissa Islam (2011), White D.y col (2019).

Factores principalmente de orden climático no hacen apta a la Argentina para el cultivo de la **Erythroxylum coca L y la Erithroxylum novogranatense** (D.Morris) Hieron, si bien otras especies silvestres del género *Erythroxylum* crecen en el norte de este país.

Se explicarán los usos tradicionales de la planta de coca como los masticatorios, consumo de infusiones, medicinales y ceremoniales que son los que mantienen en vigencia a esta controversial planta.

3.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA DE COCA.

Empezaremos ubicando a la planta de coca según el sistema de clasificación taxonómica Angiosperm Phylogeny Group (APG) III según su: Orden, Familia, Género, Especie y Variedades. **Figura 3-1.**

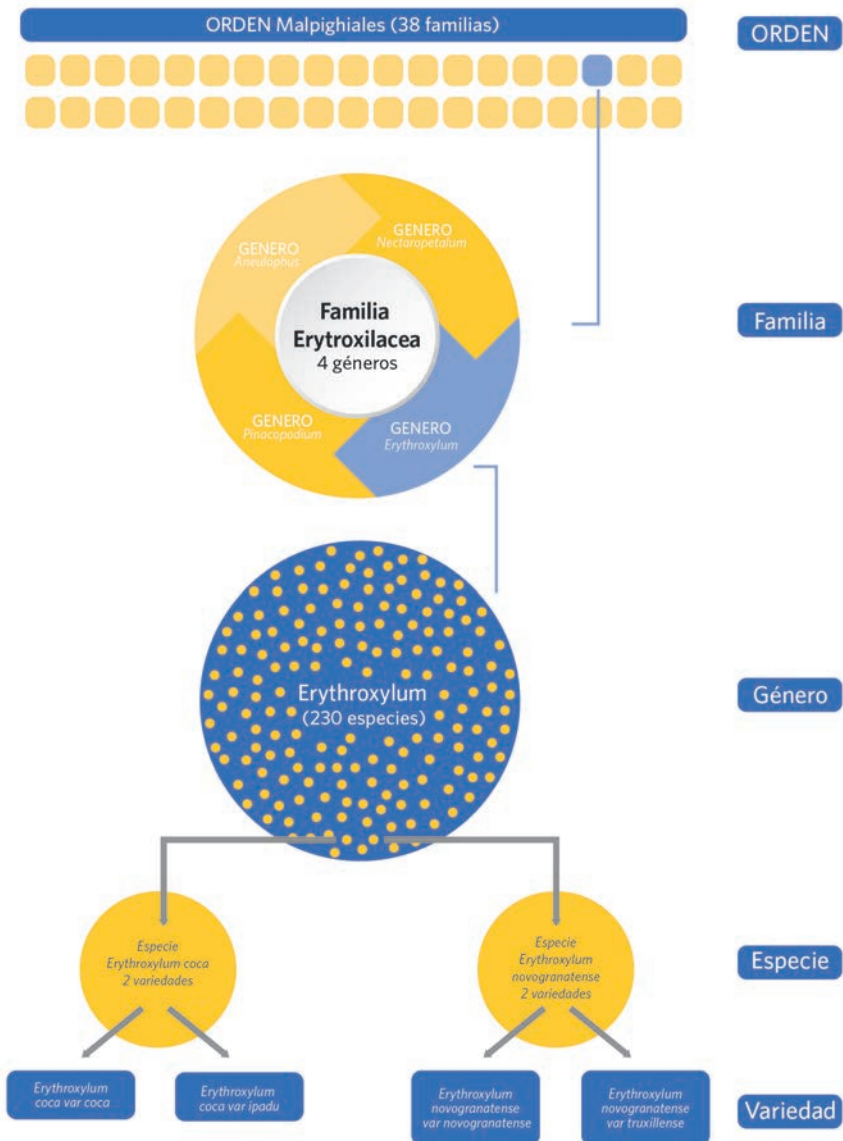


Figura 3-1: Diagrama de clasificación taxonómica de la Planta o arbusto de coca.

La planta de coca pertenece al **Orden Malpighiales** que está compuesto por aproximadamente 38 familias.

La coca pertenece a la **Familia Erythroxylaceae**, que se distribuye en el mundo según la **Figura 3-2** en regiones tropicales de América, pero también con representantes en África, Madagascar, sudeste asiático y Australia tropical.



Figura 3-2: Mapa distribución de la familia Erythroxylaceae.

La familia Erythroxylaceae tiene cuatro géneros compuestos por el siguiente número de especies:

- Género Aneulophus Benth. (con (2) dos especies)
- Género Nectaropetalum Engl. (con (6) seis especies)
- Género Pinacopodium Exell & Mendonça. (con (2) dos especies)
- Género Erythroxylum P.Browne (con (230) doscientas treinta especies)

El género Aneulophus, Nectaropetalum y el género Pinacopodium son géneros pequeños que se distribuyen principalmente en las regiones tropicales de África, el género Nectaropetalum también se encuentra en Madagascar (Islam M. 2011).

Los cuatro géneros de la familia Erythroxylaceae comparten los siguientes rasgos: arbustos y árboles glabros¹, hojas simples, enteras, estípulas intrapetirolares² parcial (o totalmente) y flores heteroestilas

¹ Desprovisto de pelo, lampiño.

² Dos estípulas de la misma hoja se sueldan por encima del pecíolo.

con un cáliz persistente de 5 lóbulos (Rury P.M 1982; Plowman T.1991)

■ **La planta de coca pertenece al género *Erythroxylum*** de la familia de las Erythroxylaceae.

El **género *Erythroxylum*** es un género poco investigado, que incluye aproximadamente 230 especies de árboles y arbustos que crecen en el trópico de los cuales alrededor de 187 especies son nativas de los neotrópicos (ecozona de la Tierra que abarca Sudamérica, América Central, Caribe, Florida del Sur y la zona sur de México) y fueron listadas por Plowman T. (2004). Solo se han estudiado 63 especies de este género (González-García K. y col 2005).

La síntesis de cocaína solamente se conoce que ocurre en el género *Erythroxylum*, luego desarrollaremos en el siguiente capítulo la biosíntesis de la cocaína y otros alcaloides que se hallan en el género *Erythroxylum*.

En 1907, Schulz dividió el género *Erythroxylum* en 19 secciones, de las cuales 8 solo contienen especies de América del Sur, haciendo esta división más fácil para las consideraciones fitoquímicas entre las especies del género. Las secciones de Schulz están basadas en algunos caracteres relacionados principalmente con las estípulas³, cálices⁴ y estilos⁵. Con el empleo principalmente de la genética, esta división enunciada por Schulz ha quedado desactualizada porque se ha descubierto que la mayoría de estas secciones son heterogéneas o variables morfológicamente y no son monofilicas⁶, si bien se sigue haciendo referencia a las secciones de Schulz en la bibliografía.

De las 230 especies en el género *Erythroxylum* **dos especies** son

³Estructuras laminares, a veces presentes, a los lados de la base del pecíolo.

⁴Ciclo externo del perianto, formado por los sépalos.

⁵Parte superior del gineceo, en forma de estilete, intermediaria entre el estigma y el ovario.

⁶En filogenia, un grupo es **monofilético** si todos los organismos incluidos en él han evolucionado a partir de una población ancestral común, y todos los descendientes de ese ancestro están incluidos en el grupo. La etimología de la palabra filogenia proviene del griego “phylon” que significa **tribu** o raza y “gen” que quiere decir producir o generar, es una **rama de la biología que se encarga de estudiar el origen y el desarrollo de las especies** de una forma global.

particularmente conocidas: **la *Erythroxylum coca* L y la *Erithroxylum novogranatense* (D.Morris)** Hieron que han sido cultivadas durante 3000 años para su uso tradicional en Sudamérica y actualmente para la producción ilegal del alcaloide cocaína. Estas dos especies comúnmente se conocen como “**coca**”, y de estas dos especies proviene toda la coca cultivada en Sudamérica. La coca fue descrita por primera vez como *Erythroxylon* por A.L. Jussieu en 1783, y posteriormente Lamarck la denominó *Erythroxylon coca* en 1786. Desde entonces esta grafía antigua aun aparece escrita en textos no especializados, y durante más de un siglo se creyó que toda la coca correspondía a una sola especie botánica.

Hasta la mitad de 1970 solo era conocida la *Erythroxylum coca*, posteriormente estudios de campo y de laboratorio de numerosos autores como Plowman T. (1979,1984); Rury P.M. (1981,1982); Bohm B.A. y col. (1982) y Rivier L. (1981); han demostrado la existencia de las dos especies de coca.

Estas dos especies de coca ya eran especies domesticadas, cultivadas en la época precolombina y empleadas por los indígenas nativos con fines ceremoniales y medicinales. El nombre general de “coca” se empezó a usar con la llegada de los españoles a América, previamente los indígenas las llamaban de distintas maneras.

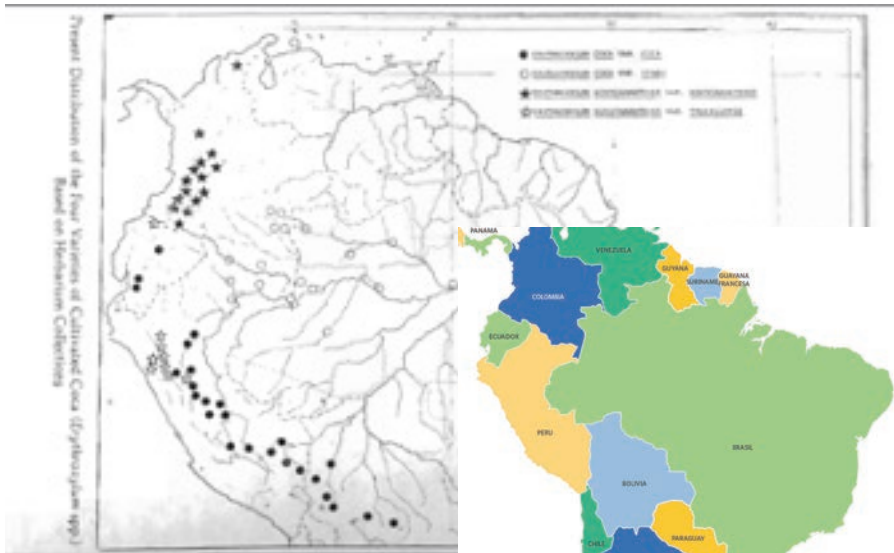
Las *E. coca* y *E. novogranatense* pertenecen a la sección 6 denominada *ARCHERYTHROXYLUM* de las 19 secciones de Schultz. Esta sección incluye aproximadamente 60 especies del neotrópico.

■ **Variedades de *Erythroxylum***

***Erythroxylum coca* L y *Erithroxylum novogranatense* (D.Morris)** Hieron se dividen en cuatro variedades :

- *E. coca* var. *coca* (Coca Huánuco o Coca Boliviana)
- *E. coca* var. *ipadu* Plowman (Coca amazónica)
- *E. novogranatense* var. *novogranatense*
- *E. novogranatense* var. *truxillense*

En la **Figura 3-3** se muestra la distribución de las cuatro variedades en Sudamérica según Plowman T. (1984)



- E. coca var. coca. Sur de Ecuador hasta Bolivia.
- E. coca var. ipadu Plowman. Principalmente en la zona de la Amazonia.
- ★ E. novogranatense var. novogranatense o “coca colombiana”.
- ☆ E. novogranatense var. truxillense “Coca de Trujillo” en valles de la costa de Perú.

Figura 3-3: Mapa con la distribución de las cuatro variedades de *Erythroxylum* en Sudamérica. (Figura modificada)

3.3 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE LAS *ERYTHROXYLUM COCA* Y *ERYTHROXYLUM NOVOGRANATENSE* (D. MORRIS) HIERON Y SUS VARIEDADES.

Se encuentran diferencias importantes adicionales entre las cuatro variedades en su anatomía de tallo y hoja, ecología, distribución geográfica y relaciones de reproducción, así como en los métodos de su cultivo y preparación para la masticación. Todas poseen el alcaloide cocaína si bien con diferencias en cuanto a alcaloides menores y otros compuestos químicos. Se han encontrado más de treinta especies salvajes de *Erythroxylum* que también producen cocaína, pero solo raramente en con-

centraciones cercanas a las variedades cultivadas. (Conzelman 2016)

Según Bohm B.A. y col (1982) estas cuatro variedades cultivadas pueden ser diferenciadas por una serie de características botánicas que se resumen en la **Tabla 3-1**.

E. novogranatense		E. coca	
var. novogranatense		var. coca	
Colombia, Venezuela		Ecuador a Bolivia	
Distribución	var. truxillense N. Perú, Ecuador	var. coca	var. ipadu Valle del Amazona
Habitat	Bosque seco a Húmedo	Desértico-Arbustos espinosos	Premontañoso-bosque húmedo
Ramas florecientes	Frondosa	Frondosa	No frondoso
Corteza de las ramas	Suave	Suave	Frondoso y no frondoso
Ramenta	Ninguna	Ninguna o pocas	Verrugosa
Estípulas	Desintegradas	Marcescente o persistente	Ninguna o pocas
Forma de las hojas	Oblonga-elíptica a oblonga-ovalada	Angosta elíptica a elíptica-lanceolada	Persistente
Nervadura media (adaxial)	Achatada	Achatada	Elíptica ancha
Líneas de las hojas (abaxial)	Presente o ausente	Presente	Filosa
Color de las hojas	Verde amarillento brillante	Verde medio	Usualmente ausente
		Verde oscuro	Verde oscura

TABLA 3-1: Datos sobre la morfología, distribución y hábitat de las cocas cultivadas (*Erythroxylum* spp.).

Según la **Tabla 3-1** y datos de Plowman T. (1985), Rury P.M. (1981), Bohm B.A. (1982) adjuntamos algunas características:

- *Erythroxylum coca* y *E. novogranatense* se pueden distinguir morfológicamente por varios caracteres de las flores, hojas, cortezas, ramitas y ramenta, aunque varias de estas características están mal conservadas en el herbario.

- Aunque ambas variedades de *E. novogranatense* están adaptadas para condiciones secas y calientes, sus semillas, como las de *E. coca*, solo duran una o dos semanas antes de secarse (Plowman T. 1984) por lo tanto, sin intervención humana, *E. novogranatense* no persistiría en la naturaleza.

- La *E. novogranatense* (ambas variedades) crecen en lugares áridos o secos, cálidos y de menor elevación, donde en general la *Erythroxylum coca* no sobrevive.

- Las dos variedades de *E. novogranatense* son muy similares en todos los caracteres, excepto en el color y la forma de las hojas y la persistencia de las estípulas.

- Las dos variedades de *E. coca* también son muy similares, difiriendo principalmente en el hábito de ramificación y caracteres de hoja y ramenta.

- *Erythroxylum coca* var. *coca* es la más cultivada para la extracción de la cocaína.

- Las cuatro variedades de *Erythroxylum* contienen cocaína y son plantas cultivadas, la distribución de estas cuatro variedades es alopátrica es decir que su separación es solo geográfica lo que impide el flujo genético entre poblaciones.

- El contenido de cocaína y cinamoilcocaína fue tempranamente reportado por Plowman T., Rivier, L. (1983). En las hojas secas de *E. coca* var *coca* la concentración media encontrada fue de 0,63% de cocaína (30 muestras), los mayores contenidos de cocaína (0,96%) se observan en plantas que se cultivan a alturas de 1400-1600 msnm, la creencia es que a mayor altura las hojas crecen más lentamente, pero son más potentes. La *E. coca* var. *ipadu* es la de menor concentración de cocaína de las cuatro variedades: 0,25% de cocaína, esta variedad crece en zonas

bajas de la cuenca del Amazonas. Las *E. novogranatense* contiene mayor porcentaje de cocaína que la *E. coca* var. *coca*. La *E. novogranatense* var. *novogranatense* produce una media de 0,77% de cocaína (3 muestras) y la var. *truxillense* 0,72%.

La cinamoilcocaína se encuentra en las cuatro variedades de *Erythroxylum*, siendo las *E. novogranatense* de mayor concentración de cinamoilcocaína que las *E. coca*.

- La *Erythroxylum coca* var. *coca* es la única reportada que crece en forma silvestre.

- Las hojas de *Erythroxylum* exhiben frecuentemente un par de “líneas laterales” o “pliegues” que corren paralelos a cada lado de la vena media. Estas líneas contribuyen a la aparición de un distintivo “panel central” dentro del cual la venación de alto orden exhibe un retículo más fino que el que se encuentra en otras partes de la hoja. Sin embargo, esta característica no tiene valor diagnóstico entre las cocas cultivadas y sus parientes más cercanos, ya que todas pueden exhibir estas líneas foliares y paneles centrales, (Rury P.M. 1981).

3.4 DOMESTICACIÓN DE LA PLANTA DE COCA, TEORÍAS.

3.4.1 Teoría Evolutiva Lineal a partir de *Erythroxylum Coca* var. *coca* (Un Ancestro En Común).

- Plowman, T. (1986) y Bohm B.A. y col. (1982) propusieron la hipótesis de una serie evolutiva lineal a partir de la *E. coca* var. *coca*. Teniendo en cuenta los perfiles de flavonoides de las variedades cultivadas, la ecología, las preferencias geográficas de las cocas cultivadas y los resultados de los experimentos de hibridización, que mostraron híbridos viables y normales entre *E. novogranatense* var. *novogranatense* y *E. novogranatense* var. *truxillense*; híbridos viables pero anormales, sin floración entre *E. coca* var. *coca* y *E. novogranatense* var. *truxillense*, e incompatibilidad completa entre *E. coca* var. *coca* y *E. novogranatense* var. *novogranatense*.

La hipótesis evolutiva lineal propuso el siguiente escenario de domesticación. Los humanos primero domesticaron *E. coca* var. *coca* en

los Andes orientales, que se cree que se originó de un pariente salvaje, presumiblemente en las estribaciones amazónicas de Perú y Bolivia. *Erythroxylum coca* var. *coca* se introdujo en las tierras bajas amazónicas y a través de la selección humana, dio lugar a *E. coca* var. *ipadu*. En un episodio diferente de migración o comercio humano, *E. coca* var. *coca* fue llevada a zonas más secas en el lado occidental de los Andes dando lugar a *E. novogranatense* var. *truxillense* y luego con una selección adicional a *E. novogranatense* var. *novogranatense*

Erythroxylum novogranatense var. *novogranatense* se creía que era un cultivo posterior basado en su carácter de incompatibilidad de hibridación con *Erythroxylum coca* var. *coca*. (Bohm B.A. y col. 1982).

Para Plowman T. (1979), las poblaciones silvestres de *E. coca* pueden haberse extinguido debido a la sobreexplotación. Plowman T. (1979) citó un estudio no publicado sobre 48 materiales trasplantado de *E. coca* var. *coca* y *E. novogranatense* var. *truxillense* en el hábitat del otro taxón, y ninguno de los dos sobrevivió en el nuevo hábitat. Para Plowman T. (1979), esto apoyó la hipótesis evolutiva lineal, pero esto podría apoyar alternativamente la domesticación independiente de dos especies.

3.4.2 Teoría Evolutiva del Ancestro Común Reciente y Grupos Hermanos:

En cambio, en la hipótesis alternativa, los dos especies cultivadas (*Erythroxylum coca* L y *Erythroxylum novogranatense*) forman grupos monofiléticos hermanos entre sí con un ancestro común reciente y donde al menos la mayoría de su domesticación fue independiente (Johnson y col. 2005 ; Emche y col. 2011).

Los estudios de Johnson y col. (2005) y de Emche y col. (2011) utilizando AFLP (amplified fragment length polymorphism) sobre *Erythroxylum coca* y *novogranatense* y sus variedades proporcionaron información sobre las relaciones y la evolución taxonómicas. A saber:

A. Existe una clara separación entre *E. coca* y *E. novogranatense* (**Tabla 3-2 y Figura 3-4**), apoyando así el tratamiento taxonómico actual que reconoce a *E. coca* y *E. novogranatense* como dos especies diferentes. Sin embargo, el nivel de diversidad genética presente en *E. novo-*

granatense vs *E. coca* es alto, cuantificado por la distancia genética media (Tabla 3-2), sumado a que la distribución geográfica de estos dos taxones es completamente alopátrica (especiación por barrera geográfica) (Plowman, T. 1979), y por los estudios de Bohm B.A. y col 1982 de la completa incompatibilidad para hibridizarse entre *E. novogranatense* y *E.coca*, **sugiere que *E. novogranatense* no puede derivarse de *E. coca*, sino que sería una especie hermana que evolucionaron separadamente en medioambientes diferentes producto de dos eventos de domesticación separados y provendrían de distintos parientes de *Erythroxylum silvestres*. Por otro lado, las cuatro variedades cultivadas mostrarían una cercanía genética mayor entre ellas que con sus parientes silvestres.**

Name of taxa	Genetic distance
<i>E. c. var. coca</i> vs. <i>E. c. var. ipadu</i>	0.299
<i>E. c. var. coca</i> vs. <i>E. n. var. novogranatense</i>	0.451
<i>E. c. var. coca</i> vs. <i>E. n. var. truxillense</i>	0.459
<i>E. c. var. ipadu</i> vs. <i>E. n. var. novogranatense</i>	0.510
<i>E. c. var. ipadu</i> vs. <i>E. n. var. truxillense</i>	0.519
<i>E. c. var. novo</i> vs. <i>E. n. var. truxillense</i>	0.060

Tabla 3-2: Distancia genética entre *Erythroxylum* cultivadas. Tomado de: Annals of Botany 95: 601-608, 2005. JOHNSON E.L y col. 5144851029802 Nro de Licencia

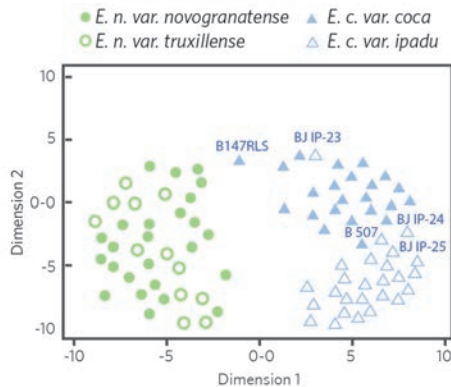


Figura 3-4: Multidimensional scaling plot of 85 *Erythroxylum* accessions based on Euclidian distance calculated from AFLP data. Tomado de: Annals of Botany 95: 601-608, 2005. JOHNSON E.L y col.

El hábitat ecológico de *E. novogranatense* se encuentra predominantemente en el norte de Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela, desde el desierto hasta el bosque húmedo, mientras que *E. coca* habita en el bosque premontano húmedo de Ecuador, Perú y Bolivia, así como el bosque lluvioso de tierras bajas de la cuenca amazónica (Plowman, T. 1982, 1984). Esta barrera geográfica entre los dos taxones sugiere que *E. novogranatense* puede tener un origen independiente de *E. coca*, como lo sugirió en principio Bohm et al. (1982), pero luego se inclinó a favor del linaje lineal desde *E. coca*.

B. En el análisis entre variedades Johnson y col. (2005) determinó:

B.1. Se detectó una diferenciación genética significativa entre *E. coca* var. *ipadu* y *E. c.* var. *coca* según surge de los resultados de la **Tabla 3-2** y **Figura 3-4** pero menor a la existente en *E. coca* vs *E. novogranatense*. El nivel significativamente más bajo de diversidad genética en *E. coca* var. *ipadu*, vs *E. coca* var. *coca*, además del hecho que *Erythroxylum coca* var. *ipadu* posee similitudes morfológicas y perfiles flavonoides idénticos con *E. coca* var. *coca* (Bohm y col. 1982), apoya la opinión actual de que *E. coca* var. *ipadu* es un cultivo derivado de *E. coca* var. *coca*. La diferencia genética entre *E. coca* var. *ipadu* es atribuida por Johnson y col. (2005) a que fue cultivada en una zona geográfica distinta que *E. coca* var. *coca*, pasó de los Andes orientales en Perú y Bolivia hacia la cuenca amazónica de tierras bajas donde fue sometida a formas de cultivo diferentes de “tala y quema”, donde las parcelas se cambiaban anualmente o cada dos años esto pudo haber resultado en una deriva genética y el aislamiento de la población.

B.2. Como se observa en la **Tabla 3-2** y **Figura 3-4** la distancia genética entre *E. n.* var. *novogranatense* y *E. n.* var. *truxillense* es insignificante, además tiene una morfología similar y son capaces de hibridarse (Bohm et al., 1982), esto podría plantear dudas en que fueran dos variedades distintas. Por lo tanto, según Johnson y col. (2005) las principales diferencias genéticas que pueden justificar la separación de *E. novogranatense* var. *truxillense* de *E. novogranatense* var. *novogranatense* es que la primera tiene una mejor adaptabilidad a los hábitats ecológicos más secos en el norte de Perú y el sur de Ecuador, así como

distintos flavonoides de las hojas.

3.4.3 Nuevas Teorías de la Domesticación de La Coca.

Los estudios de filogenia de White D.M. y col. (2019) refutan la hipótesis de la evolución lineal de Plowman T. y Bohm B.A. y col. sugieren una historia de domesticación más complicada que la presentada por Johnson y col. (2005). White D.M. (2019) propone que dos especies silvestres *E. cataractarum* y *E. gracilipes* como las más cercana genética y morfológicamente a las especies cultivadas y posiblemente a sus progenitores salvajes. Estas dos especies salvajes o silvestres: *E. cataractarum* y *E. gracilipes* podrían ser un complejo de especies involucradas en dos eventos de domesticación independientes de coca: uno en el que *E. novogranatense* fue domesticado de poblaciones silvestres de *E. cataractarum* en el norte de América del Sur, y el segundo en el que *E. coca* fue domesticado de poblaciones de *E. gracilipes* en la cuenca del Amazonas o en las regiones de Yungas andinas. A consideración de los autores la distinción entre estas posibilidades requerirá análisis más centrados dentro de las especies cultivadas y sus parientes cercanos, lo que conducirá a una mejor comprensión de la historia de esta controvertida planta.

Según White (2019), reporta que curiosamente *E. gracilipes* no crece en la región ocupada por *E. cataractarum* y ambas especies son morfológicamente muy similares a las cocas cultivadas. *Erythroxylum gracilipes* produce cocaína, pero un solo análisis del material del herbario de *E. cataractarum* no contenía el alcaloide según reporte de la bibliografía. Sin embargo, anecdóticamente, la hoja amarga de *E. cataractarum* sugiere un alto contenido de alcaloides (DM White, datos no publicados) por otro lado los indios Barasana del Brasil cultivan coca amazónica (*E. coca* var. *iapdu*), pero cuando esta no está disponible usan las hojas “fuertes” de *E. cataractarum*.

3.5 CULTIVO DE LA COCA

Las cuatro variedades de coca cultivadas son arbustos delgados que alcanzan de uno a cuatro metros de altura y poseen hojas de color verde

brillante. Sus pequeñas flores blancas crecen a lo largo de las ramas y dan lugar a frutos rojos, naranjas o amarillos que las aves tropicales comen fácilmente. Es una planta de uso ornamental o de jardín en países sudamericanos por ser una planta esbelta y elegante.

Según Neumann R. (2004): todas las variedades de coca son arbustos de follaje perenne y se multiplican por semillas con una viabilidad entre 3 y 4 semanas en el ambiente tropical. Por esta razón los frutos o drupas, que contienen una sola semilla, se cosechan casi maduros, cuando viran del color verde al rojo. Cuando la pulpa del fruto se ablanda, se lava y la semilla limpia se seca al sol. La E. coca var coca como las dos variedades de E. novogranatense difícilmente se propagan vegetativamente, lo hacen a través de reproducción por semillas; E. coca var. ipadu puede tener reproducción vegetativa⁷ mediante enraizamiento rápido de esquejes de tallo (Bohm B.A. 1982). Las semillas se siembran en almácigos directamente en tierra, aunque modernamente también en bolsines de plástico, y germinan en 24 días con luz solar directa. Cuando los plantines tienen 4 hojas verdaderas se cubren con tapaderas durante seis meses para evitar quemaduras de sol. Cuando los plantines tienen 30 a 40 cm de altura se trasplantan a campo durante la siguiente estación lluviosa, y generalmente a raíz desnuda. A los 2 años comienza la primera cosecha. A mayores altitudes se cosecha 3 veces al año y en zonas bajas hasta 4 veces, con defoliación casi completa (Bastien, 1987). Diversos factores afectan el rendimiento, pero principalmente la fertilidad natural del suelo, ya que la coca no se fertiliza. Las diversas cosechas anuales totalizan entre 1700 a 2250 kg/ha de hojas secas y las plantaciones se renuevan cada 15 a 20 años (Purseglove, 1977). Conzelman y col (2016) mencionan: Huánuco coca, la variedad más común, puede producir de cuatro a seis cosechas por año por hasta 40 años. No hay otra planta leñosa que se coseche con tanta frecuencia y tiempo y que mantenga durante todo ese período un buen rendimiento y calidad de las hojas. (Johnson (1996)).

⁷La multiplicación o propagación vegetativa es la producción de una planta a partir de una célula, un tejido, un órgano o parte de una planta madre.

En sus ambientes naturales el principal factor limitante del cultivo de coca son las malezas dado el clima húmedo y cálido, especialmente en suelos de baja fertilidad natural. Las plagas insectiles son básicamente hormigas cortadoras que destruyen hojas y raíces, orugas cortadoras de hojas, y minadores de tallo. También hay hongos que atacan hojas y ramas tiernas, y un hongo de suelo, *Fusarium oxysporum* ssp. *erythroxyli* que destruye totalmente las raíces. (Neumann R. 2004)

Las cuatro variedades de *Erythroxylum coca* y *novogranatense* se muestran en las Imágenes 3-1; 3-2; 3-3; 3-4. (Fueron bajas de internet)



Imagen 3-1: *Erythroxylum coca* var. *coca*.



Imagen 3-2: *Erythroxylum coca* var. *Ipadu*.
(Fuente: Dick Culbert. License cc-by-3.0)



Imagen 3-3: *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense*.

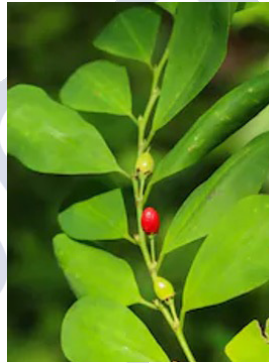


Imagen 3-4: *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense*.

3.5.1 Especies de *Erythroxylum* en Argentina y viabilidad de cultivo de las especies *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense*.

En Argentina el cultivo de *Erythroxylum coca* Lam y *Erythroxylum novogranatense* es nulo o prácticamente inexistente por varias razones, sin lugar a dudas la característica climática del país es la más importante.

Según el Ing. Neumann R. (2004) las dos especies de coca: *Erythroxylum coca* y *E. novogranatense* con sus 4 variedades son de ambientes tropicales, sin incidencia de heladas. Paralizan la fotosíntesis con temperaturas inferiores a 12°C y temperaturas inferiores a 4°C pueden cau-

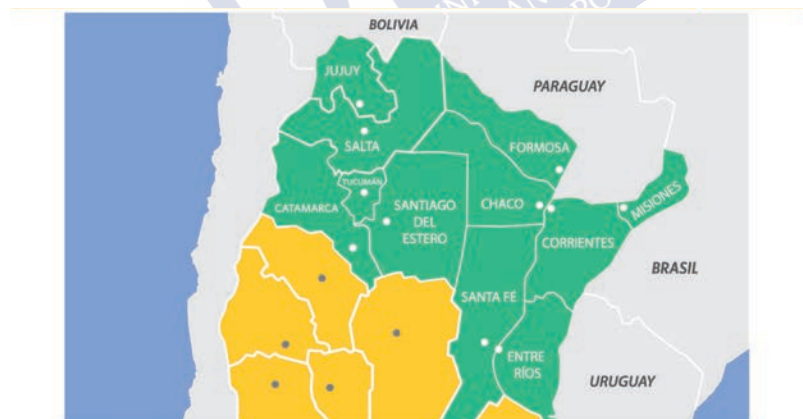
sar daños irreversibles en follaje, aunque no matan la planta.

A pesar de que Argentina posee territorios septentrionales insertos en latitudes intertropicales (entre los trópicos de Cáncer y Capricornio), es posible afirmar que el país carece de climas genuinamente tropicales, es decir, los exentos por completo de temperaturas por debajo de 0°C. La razón de la falta de climas tropicales se debe a la inexistencia de cordilleras orientadas longitudinalmente, las que permitirían detener los helados vientos invernales que soplan desde el cuadrante sur, procedentes de las regiones australes y la Antártida.

Otros puntos que conspiran con la implantación de la coca cultivada en la Argentina, son la falta de población campesina que viva en esas selvas argentinas (lo cual redundaría en la dificultad de la manutención y cosecha de la coca) y los mayores costos de la mano de obra en la Argentina.

¿Qué especies de *Erythroxylum* hay en la Argentina?

En la República Argentina hay 5 especies nativas con 4 variedades según Ing. Neumann (2004) tomado de Zuloaga y Morrone, (1999). En la **Tabla 3-3** se detallan.



(+) 0.0001-0.0005% cocaína por gramo de hoja seca.

NQ: no cuantificable (presencia del ion target 182 y del ion molecular 303 sin confirmar el ion 272).

ND: Total ausencia del ion molecular 303.

Especie nativa	Variedad	Distribución	Cocaína
<i>Erythroxylum argentinum</i> O.E.Schulz (+)	-	Argentina: Catamarca, Jujuy, Misiones, Salta, Santa Fe, Santiago del Estero y Tucumán. También en Bolivia y Brasil.	(+)
<i>Erythroxylum cuneifolium</i> (Mart.) O.E. Schulz. (NQ)	var. <i>cuneifolium</i>	Argentina: Chaco, Corrientes, Formosa, Salta y Santa Fe. También en Bolivia, Brasil y Paraguay.	NQ
	var. <i>silvaticum</i>	Argentina: Salta. También en Bolivia y Brasil.	
<i>Erythroxylum deciduum</i> A.St.-Hil. (+)	var. <i>deciduum</i>	Argentina: Misiones. También en Brasil y Paraguay.	(+)
	var. <i>opacum</i> O.E. Schulz	Argentina: Misiones. También en Brasil.	
<i>Erythroxylum microphyllum</i> A.St.-Hil.	-	Argentina: Corrientes, Entre Ríos, Misiones y Santa Fe.	(-)
<i>Erythroxylum myrsinites</i> Mart. (ND)	-	Argentina: Corrientes y Misiones. También en Brasil, Paraguay y Uruguay.	ND

Tabla 3-3: Especies nativas de *Erythroxylum* en la Argentina y su distribución geográfica.

NOTA: El contenido de cocaína en las hojas de coca varía según la especie y variedad de *Erythroxylum*. A modo de comparación con las *Erythroxylum* citadas en la tabla, las especies cultivadas de *Erythroxylum* (*E. coca* y *E. novogranatense*) poseen una media de cocaína entre 0,11% a 0,77% según la especie y variedad, aproximadamente 1000 veces más que las especies de *Erythroxylum* de Argentina.

Las tres primeras especies se las suele denominar “coca del monte”. Ninguna de las cinco especies nativas tiene propiedades medicinales.

Novak M. y col (1984), Plowman T. y Rivier L. (1983), han reportado el contenido de cocaína de hasta en 23 especies salvajes de *Erythroxylum* de las 230 descritas. Novak y col (1984) mencionan que las especies salvajes contienen cantidades trazas de cocaína con excepción de dos especies de Venezuela *E. recovers Huber* and *E. steyermarkii*

Plowman, que contienen cocaína a niveles comparables a las cuatro variedades de coca cultivada (*E. coca* y *E. novogranatense*).

El contenido de cocaína de las *E. coca* y *E. novogranatense* está en el rango de 0,2 a 1% en peso de hoja seca, mientras que las especies salvajes no tienen más de 0,01% (Plowman T. y Rivier L. 1983).

Algunas de las especies de *Erythroxylum* que poseen cocaína que han sido citadas por Novak M. y col. (1984):

- E. acuminatum* (Am.) Walp. (Holmstedt et al., 1977)
- E. areolatum* L. (Plowman and Rivier, 1983)
- E. campestre* St. Hil. (Aynilian et al., 1974)
- E. deciduum* St. Hil. (Aynilian et al., 1974)
- E. fimbriatum* Peyr. (Plowman and Rivier, 1983)
- E. glaucum* O.E. Schulz (Plowman and Rivier, 1983)
- E. gracilipes* Peyr. (Plowman and Rivier, 1983)
- E. aff. impressum* O.E. Schulz (Plowman and Rivier, 1983)
- E. incrassatum* O.E. Schulz (Plowman and Rivier, 1983)
- E. lucidum* H.B.K. (Plowman and Rivier, 1983)
- E. macrocnemium* Mart. (Plowman and Rivier 1983)
- E. panamense* Turcz. (Aynilian et al., 1974)
- E. pegeterianum* St. Hil. (Aynilian et al., 1974)
- E. pulchrum* St. Hil. (Aynilian et al., 1974)
- E. recurrens* Huber (Plowman and Rivier, 1983)
- E. rotundifolium* Lunan (Plowman and Rivier, 1983)
- E. shatona* Macbride (Plowman and Rivier, 1983)
- E. steyewarkii* Plowman (Plowman and Rivier, 1983)

3.6 USOS MEDICINALES DE LA COCA

Garcilaso de la Vega (1609) se refiere a la hoja de coca:

“ ... Ella preserva el cuerpo de muchos males y los médicos la utilizan bajo forma de polvo para evitar que las heridas se infecten, para ayudar la soldadura de los huesos fracturados. Y sí ella es tan eficaz para las enfermedades externas, con propiedades inexplicables, que bien deben hacer a las entrañas de los que las mascan? ... ”

Weil A.T. (1981), Biondich A.S. y col. (2015-2016), Restrepo- Saenz y col (2019), Bauer (2019), Conzelman y col (2016) y otros hacen una revisión sobre los usos medicinales de la coca.

La coca es una planta medicinal milenaria que ha sido empleada a través de los tiempos por los indígenas sudamericanos para tratar ciertas dolencias como así también como estimulante.

El uso de esta planta en la medicina moderna ha llegado a través de los conocimientos etnomédicos ya sea relatos de los consumidores locales o de la experiencia de personas que se dedican a curar enfermedades, poco son los estudios científicos modernos que han corroborado el verdadero valor medicinal de esta planta. Escaso es el conocimiento sobre las interacciones entre los constituyentes químicos de la hoja de coca, si bien en general es a los alcaloides de la coca a los que se les atribuye sus efectos (Restrepo y col. 2019).

González-García Kethia y col (2005) solo encuentran 22 publicaciones referidas a temas etnomédicos de las *Erythroxylum* desde los años 1940 a 2004 prueba del bajo estudio científico que se ha hecho del género *Erythroxylum* en general.

González-García Kethia y col (2005) mencionan: “Las principales propiedades etnomédicas atribuidas a este género son: estimulantes (12,6%), inducción de euforia (10,8%) y contra la fatiga (10,8%), el alivio de la sensación del hambre (10,8%), problemas estomacales (4.5%), cefaleas y dolor de garganta (3,6%). También las especies de este género se han utilizado contra la fiebre, los desórdenes hepáticos y renales, como anestésico local, afrodisíaco, antihemorrágico, anti-inflamatorio, cicatrizante, alimenticio entre otras”. Estas características del género *Erythroxylum* se refieren sobre todo a las especies coca y novogranatense y sus cuatro variedades.

La forma más frecuente de administración es a través de infusiones o decocciones. Las hojas secas (72%) son los órganos de la planta más utilizados, siguiendo las hojas frescas (15%) y en menor medida aparecen registradas el conjunto de hojas y ramas (3%); las frutas frescas (2%); las raíces secas (2%) y en menor frecuencia, el uso de la madera del tronco y el material seco de la corteza, las ramas y los frutos.

3.6.1 Tratamiento síntomas gastrointestinales y salud oral.

En la medicina andina tradicional, la coca se usaba para aliviar úlceras, lesiones, espasmos y dolores del tracto gástrico, náuseas y diarrea. La coca se dice ayuda a asimilar más nutrientes de los alimentos.

Las hojas de coca también se aplican comúnmente a las llagas en la boca porque se cree que promueven la curación de las lesiones orales. Se usan tanto para aliviar el dolor de muelas como profiláctico para mantener los dientes blancos y resistentes a las caries.

Weil A.T. (1981) mencionó que la cocaína y otros alcaloides de la coca, pertenecen a la serie de tropanos y pueden ejercer algunos efectos atropínicos sobre los músculos lisos y las glándulas.

Weil A.T. (1981) y otros han especulado que la acción anestésica tópica de los alcaloides de la coca puede alterar los circuitos de retroalimentación negativa entre el sistema nervioso central y el tracto digestivo que generan estos síntomas, mejorando así las secreciones, relajando los músculos digestivos y regulando la acidez.

3.6.2 Efectos sobre el rendimiento, disminución del apetito, efectos metabólicos y cardiovasculares.

Uno de los efectos mejor conocidos de la masticación de las hojas de coca es el aumento del rendimiento físico. Los estudios de Casikar V. y col. (2010), mostraron que durante el ejercicio físico moderado hay acumulación de glucosa, pirúvico y glicerol en los masticadores de hoja de coca, y proponen una inhibición por las hojas de coca del camino glicolítico de la glucosa a nivel de la Pyruvate Dehydrogenase (originando la acumulación de glucosa y pirúvico) y del camino oxidativo del glicerol produciendo la acumulación de éste. El cuerpo emplea entonces como fuente de energía la grasa que se hidrolizará a glicerol y ácidos grasos, éstos últimos entran al ciclo de Krebs por beta-oxidación dando la energía necesaria para el ejercicio. El cambio de la glucólisis a la lipólisis es una adaptación a niveles bajos y prolongados de actividad y al uso eficiente de las fuentes de energía. Es posible que las hojas de coca tengan adaptógenos, que son capaces de influir en el cambio dependiendo del nivel de actividad. Los autores sugieren que el efecto de

mascar hojas de coca sea probablemente del contenido de flavonoides de la hoja y no de su contenido en cocaína.

Estos cambios en la homeostasis de la glucosa podrían explicar también la menor sensación de hambre de los indígenas andinos (Biondich A.S. y col 2016 y Weil A.T. 1981) y según Weil A.T. (1981) el uso de la coca ayudaría en los regímenes de control de peso, así como, potencialmente, el control de la diabetes.

La policitemia es la respuesta del organismo al incremento de la altura debido a la disminución de la presión parcial del oxígeno en el aire, los dos síntomas de la policitemia son la fatiga y el dolor de cabeza. El hombre andino vive a más de 2000 msnm y el mascado de hojas de coca también se cree sería favorable para esta patología ya que está asociado a un mejor flujo sanguíneo por una disminución en la viscosidad de la sangre. Fuchs A. y col. (1978), propuso que esto puede deberse al comportamiento de los alcaloides de la coca, similar a la atropina, que reduce temporalmente la tasa de producción de glóbulos rojos (por inhibición de la eritropoyesis) al deprimir la coca áreas críticas del hipotálamo posterior; esta zona está también relacionada con la sensación del hambre y sed que precisamente estaría también controlada en el hombre andino por el mascado de hojas de coca. La hipótesis de Fuchs A. y col. (1978) requiere mayores estudios para su comprobación dado que los bajos niveles de hematocrito y hemoglobina hallados en los mascadores de hoja de coca nativos de la zona andina pueden deberse también a un estado de malnutrición o a infección parasitaria por anquilostomas.

El uso de la coca produce también una menor pérdida del calor por la acción vasoconstrictora de sus constituyentes, el hombre andino reporta una acción protectora contra el frío al mascar hojas de coca.

3.6.2.1 Otros usos.

La coca podría **aumentar el rendimiento sexual** a través de sus efectos sobre el metabolismo de la glucosa, el estado de ánimo y el flujo sanguíneo relacionado con sus alcaloides, flavonoides y contenido de nutrientes. Zanolari y col. (2003) mencionan que también otras especies

de *Erythroxylum* son empleadas como afrodisíacas. La corteza de dos plantas endémicas de Brasil *E. vacciniifolium* y *E. catuaba* son usadas para mejorar el rendimiento sexual por los indígenas locales y como remedio para el tratamiento de la disfunción eréctil.

- La coca podría **ser empleada para ciertos trastornos mentales como la depresión**, por sus efectos que mejoran el estado de ánimo Weil (1981). Se hipotetiza que la coca podría ser también empleada para los tratamientos del déficit de atención y trastorno de hiperactividad (AD-HD) con similares beneficios a los tratamientos actuales con el metilfenidato y las anfetaminas, la coca contiene varios estimulantes de la familia del tropano. También el uso de la coca está propuesto para el tratamiento a la adicción de estimulantes (Restrepo y col 2019). Todas propuestas que requieren de estudios científicos para ser corroboradas.

- Uso nutricional:** el uso de la harina de coca (hojas finamente divididas) en la preparación de panes, tortas, pastas y otros es conocido especialmente en Bolivia, para aumentar el aporte de vitaminas y minerales en los alimentos. Particularmente, la hoja de coca contiene cantidades significativas de proteínas, carbohidratos, fibra, minerales (especialmente calcio, fósforo y hierro) y vitaminas, como tiamina, riboflavina y caroteno. Pero no hay todavía un estudio científico que pueda avalar que los minerales y vitaminas de las hojas sean asimilados por nuestro cuerpo, en especial cuando la hoja es mascada porque la misma es tirada y no tragada lo que obstaculiza la total absorción además hay quienes cuestionan la biodisponibilidad de los nutrientes de la coca por la presencia de inhibidores de absorción que existen en vegetales verdes como las hojas de coca. (Conzelman y col. (2016), Restrepo y col. (2019). Penny y col. (2009) en sus estudios concluyeron que además del problema de seguridad derivado del contenido de alcaloides tóxicos y su efecto anoréxico, no encontraron que las hojas de coca tengan una ventaja nutricional sobre otras hojas, como el orégano, el perejil o el cilantro. Además, la presencia de inhibidores puede limitar la biodisponibilidad de micronutrientes y reducir aún más cualquier potencial nutricional de hoja de coca.

3.7 MASCADO DE LA HOJA DE COCA

La masticación de la hoja de coca o más conocido como el aculli (un término derivado del verbo aymara akhulliña y en español como mascar), es la manera más conocida del uso de la hoja de coca, la mayor divergencia se da en la coca amazónica donde la coca se consume como polvo. En realidad, las hojas no se mascan, sino que se chupa el líquido humedecido de las hojas para extraer los jugos, que lentamente gotean en el estómago. Se colocan varias o de una a la vez y se humedecen lentamente con saliva. Con la saliva se hacen flexibles y se van acomodando entre la mandíbula y la mejilla y se va formando un bolo en un lado de la boca. Es conveniente cortar el pecíolo de la hoja para que no lastime las encías o la mejilla.

Según Plowman T. (1985), durante las primeras etapas de la masticación, todas las variedades de coca son claramente amargas debido a la presencia de alcaloides, principalmente cocaína. Esta amargura se contrarresta mediante la adición de una sustancia alcalina, como cal en polvo o cenizas, o incluso bicarbonato de sodio entre masticadores no nativos. La cal en polvo se transporta tradicionalmente en una pequeña botella de calabaza y se agrega al líquido con un cazo o palo delgado. El álcali no solo “endulza” la masticación, sino que también potencia notablemente sus efectos, tanto para adormecer las mejillas y la lengua (a través del efecto anestésico de la cocaína) como para aumentar el efecto estimulante. Dosis adicionales de álcali se agregan periódicamente al líquido para mantener su efecto en la masticación; se pueden agregar más hojas hasta que el bolo alcance un tamaño óptimo para el masticador.

La cantidad de tiempo que el bolo de coca se mantiene en la boca varía, dependiendo del usuario individual, de aproximadamente 30 a 90 minutos o hasta 2 horas, después de lo cual el bolo gastado, (ha perdido su sabor) o jach'u, es eliminado. La cantidad de coca masticada también varía según el gusto individual y la disponibilidad, que generalmente varía de 25 a 75 gramos de hojas por día con un promedio de aproximadamente 50 gramos. En Argentina es variable la cantidad mascada por día, puede ser mucho menor a la reportada por Plowman 1985 e incluso

puede no mascarse todos los días.

En América del Sur, se usan varias palabras para denotar la masticación de coca: mambear (Colombia); chacchar, acullicar, pijchear (Perú, Bolivia); coquear y mascar (general).

Las hojas de coca que se mastican deben ser previamente secadas y este procedimiento varía entre las especie y variedades de *Erythroxylum*. Plowman T. (1984) describe detalladamente este proceso (Tabla 3-4).

Erythroxylum coca L	
var. Coca Coca Huánuco	var. Ipadu Coca Amazonica
Esta variedad de coca se cultiva en la montaña y al igual que la coca Trujillo puede secarse al sol, pero por las constantes lluvias el cultivo se daña con frecuencia. Se emplean también grandes hornos de secado que funcionan con leña, pueden ser de dos o tres pisos y las hojas son colocadas sobre bastidores sobre capas porosas y el calor asciende sobre ellas, de esta forma grandes cantidades de hoja se pueden secar en tan solo algunas horas, a la hoja se le permite luego de secada “sudar” o rehidratarse para volverse flexible. Una variación interesante en la preparación de la coca es pisada o coca pisoteada, las hojas de coca recién cosechadas se extienden por el patio o el suelo y luego son pisoteadas por uno o dos trabajadores descalzos durante aproximadamente media hora, normalmente al sol. El procedimiento de machacado hace que las hojas tengan un color parduzco y un sabor especial. La hoja Huánuco es la variedad más susceptible al deterioro produciendo amins malolientes, a diferencia de la coca Colombia y la coca Trujillo que tiene altos niveles de aceites aromáticas que retardan o previenen su descomposición. Las hojas de coca mal secada no son aptas para el mascado.	Se secan por un método similar a la coca colombiana. La coca colombiana se cosecha y preparan diariamente debido a su rápido deterioro en las tierras bajas tropicales. La coca var. Ipadu se seca en cuencos o sartenes de cerámica y luego se reducen a un polvo fino golpeando con un mortero y un pilón y se tamizan, probablemente esta modalidad sea consecuencia de las hojas que son más grandes y poco manejables y por el bajo contenido de cocaína de la coca amazónica.

Tabla 3-4 (Parte 1): Forma de secado de las hojas de coca.

Erythroxylum novogranatense	
var. Novogranatense Coca Colombiana	var. Truxillense Coca Trujillo
Después de que se cosecha, la coca colombiana se empaca en grandes sacos y se deja fermentar ligeramente durante la noche antes de proceder a su tostado en sartenes de cerámica sobre un fuego suave de leña, el sartén se gira para evitar que la hoja se queme. El característico color verde amarillento brillante cambia a marrón amarillento durante este proceso y se pierde en el tostado el olor a salicilato presente en la hoja fresca. La hoja recién tostada es muy frágil y no apto para el mascado hasta que reabsorben humedad ambiente y se vuelven suaves y flexibles.	Se cultiva en una zona cálida por lo que las hojas se secan en patios de tierras en las que se mueven constantemente hasta que están secas. Desprenden durante el proceso un fuerte aroma a gaulteria (olor dulce leñoso por el salicilato de metilo), el olor disminuye y casi desaparece cuando llega a los mercados. La coca truxillensis es controlada por la Empresa Nacional de la Coca (ENACO) y parte de esta producción es exportada a los Estados Unidos para la extracción de aromatizantes para la empresa Coca Cola® y para la extracción de la cocaína farmacéutica.

Tabla 3-4 (Parte 2): Forma de secado de las hojas de coca.

3.7.1 Sustancias alcalinas adicionadas a las hojas de coca.

Las hojas de coca en general son mascadas con el agregado de sustancias alcalinas o de otros aromatizantes o potenciadores de la masticación. El agregado de estas sustancias es muy antiguo.

Los aditivos alcalinos a la coca son de dos tipos básicos: cenizas de plantas y cal de piedra caliza, conchas o huesos quemados. Según la zona se usan los distintos tipos de álcalis, según Plowman (1984), en la mitad norte de los Andes se emplea la cal, en la mitad sur y en la cuenca del Amazonas predominan las plantas, en las zonas costeras, como la costa caribeña de América del Sur, la costa del Pacífico del Perú, las conchas son la fuente alcalina preferida, están fácilmente disponibles. En el interior de Colombia y en partes de los Andes del norte de Perú, se recogen rocas calizas de áreas conocidas y horneadas para hacer una

cal en polvo que se denomina “mambe” en Colombia y “ishku” en Perú.

River L. (1981) determinó en 17 sustancias alcalinas empleadas en el mascado de la hoja de coca: Tocra de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd); Tocra de Platano (*Musa* sp. roots); Llipta de haba (*Vicia faba* L.); Llipta de Quinoa; Cal de piedra; Tocra de Toknay; Llipta de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen); Cal de Mariscos; Cal de Turjillos entre otros) un pH en un rango de 10 a 11 en llipta hecha de tallos de quinoa a mayor de 12.6 en cal hecha de conchas marinas. La composición química de estas sustancias alcalinas es poco conocida y no es constante, en general tienen CaCO_3 , MgCO_3 , KHC0_3 , sulfato, cloruro y fosfato.

El empleo de sustancias alcalinas durante el mascado facilita la liberación de la cocaína como base, del conjugado con ácido en la planta. La hidrólisis de la cocaína, por el empleo de sustancias alcalinas, cuando se incubaron hojas de coca al pH de las sustancias alcalinas no excedió el 17% después de 1h a 37°C.

En Argentina es común el empleo de bicarbonato de sodio como sustancia alcalina y de la yista o llipta. **Imagen 3-5.**



Imagen 3-5: Yista o llipta. (Fuente: Semanario Nueva Propuesta-Salta-modificada)

El Chamairo es una enredadera *Mussatia hyacinthina* (Standl.), que también suele emplearse para agregarse al bolo de hoja de coca, como saborizante y edulcorante. La pasta de tabaco también es usada por algunas tribus de las amazonas o de Perú.

Referencias

1. Argimon, X; Trigo, M.M.T. Glosario de Botánica de Flora Ornamental Española <https://www.arbolesornamentales.es/glosario.htm>
2. Bauer, I. Travel medicine, coca and cocaine: demystifying and rehabilitating *Erythroxylum* – a comprehensive review. *Bauer Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines* (2019) 5:20. <https://doi.org/10.1186/s40794-019-0095-7>.
3. Bieri, S., Brachet, A.; Veuthey, J.C; Christen, P. Cocaine distribution in wild *Erythroxylum* species. *Journal of Ethnopharmacology* 103 (2006) 439–447.
4. Biondich, A.S; Joslin, J.D. Coca: High Altitude Remedy of the Ancient Incas. *Wilderness & Environmental Medicine*, 26, 567–571 (2015).
5. Biondich, A.S; Joslin, J.D. Review Article Coca: The History and Medical Significance of an Ancient Andean Tradition. *Hindawi Publishing Corporation Emergency Medicine International Volume 2016, Article ID 4048764*, 5 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4048764>.
6. Bohm, B.A; Fred R. Ganders, F.R.; Plowman, T. Biosystematics and Evolution of Cultivated Coca (*Erythroxylaceae* Source: *Systematic Botany*, Vol. 7, No. 2 (Apr. - Jun., 1982), pp. 121-133 Published by: American Society of Plant Taxonomists Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2418321>.
7. Casikar, V.; Mujica, E.; M. Mongelli, M.; Aliaga, J.; Lopez, N.; Smith, C.; Bartholomew, F. Does Chewing Coca Leaves Influence Physiology at High Altitude? *Ind J Clin Biochem* (July-Sept 2010) 25(3):311–314 DOI 10.1007/s12291-010-0059-1.
8. Conzelman, C. S; Dawson M White. The Botanical Science and Cultural Value of Coca Leaf in South America. *Roadmaps to Regulation: Coca, Cocaine, and Derivatives Part I: Background - History & Overview of Use*. Chapter · April 2016.
9. Harmetz et al. United States Patent. <https://patentimages.storage.googleapis.com/08/76/52/0a282e7fd0f7e5/US4956429.pdf>.
10. Islam, M. Tracing the Evolutionary History of Coca (*Erythroxylum*) University of Colorado at Boulder, Tesis.2011_ https://scholar.colorado.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1015&context=ebio_gradetds. melissa.islam@gmail.com
11. Emche, S. D.; Dapeng Zhang, Melissa B. Islam, Bryan A. Bailey, Lyndel W. Meinhardt. AFLP Phylogeny of 36 *Erythroxylum* Species Genetic Relationships Among *Erythroxylum* Species Inferred by AFLP Analysis. Article in *Tropical Plant Biology* · January 2011. DOI 10.1007/s12042-011-9070-9.
12. Fuchs, A.; Roderick E. Burchard, C. C. Curtain, Paulo Roberto De Azeredo,

A. Roberto Frisancho, Joseph A. Gagliano, Solomon H. Katz, Michael A. Little, Richard B. Mazess, E. Picón-Reátegui, Lowell E. Sever, D. Tyagi and Corinne Shear Wood. Coca Chewing and High-Altitude Stress: Possible Effects of Coca Alkaloids on Erythropoiesis [and Comments and Reply]. *Current Anthropology* Vol. 19, No. 2 (jun., 1978), pp. 277-291 (15 pages)- read on line: https://www.jstor.org/stable/2741994?read-now=1&refreqid=excelsior%3A30576cd32437e2a33a5ce8afbd41bbc&seq=5#page_scan_tab_contents

13. González-García K, González-Lavaut José Antonio, Johannes González-Guevara, Sylvia Prieto-González. Género *Erythroxylum*: Análisis de la Información Científica. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (2): 284-90 (2005).

14. JOHNSON, E.L, DAPENG ZHANG and STEPHEN D. EMCHE. Inter- and Intra-specific Variation among Five *Erythroxylum* Taxa Assessed by AFLP. *Annals of Botany* 95: 601–608, 2005. doi:10.1093/aob/mci062, available online at www.aob.oupjournals.org.

15. Metaal, P. Coca in Debate: The Contradiction and Conflict Between the UN Drug Conventions and the Real World. Chapte from book *Controversies on the regulation of traditional drug use* (pp.25-44). DOI: 10.1007/978-3-642-40957-8_2.

16. Neumann, R. 2004. APTITUD ECOLÓGICA PARA EL CULTIVO DE COCA (*ERYTHROXYLUM* SP.) EN EL NOA. E.E.A. INTA Salta, Boletín Desideratum 2(19). www.produccion-animal.com.ar

17. Novak, M.; Salemink, C.A.; Khan, I. Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense*. *Journal of Ethnopharmacology*, 10 (1984) 261-274

18. Penny M, Zavaleta A, Lemay M, Liria M, Huaylinas M, Alminger M, McChesney J, Alcaraz F, Reddy M. Can coca leaves contribute to improving the nutritional status of the Andean population? *Food Nutr Bull.* 2009; 30:205–16.

19. Plowman T. The Ethnobotany of Coca (*Erythroxylum* spp., *Erythroxylaceae*). Source: *Advances in Economic Botany*, Vol. 1, *Ethnobotany in the Neotropics* (18 September 1984), pp. 62-111. Published by: New York Botanical Garden Press Stable URL: <https://www.jstor.org/stable/43931370>. Accessed: 23-12-2019 13:51 UTC.

20. Plowman T. Coca and cocaine. Effects on People and Policy in Latin America. Proceedings of the Conference the Coca Leaf and Its Derivatives -Biology, Society and Policy Sponsored by the Latin American Studies Program (LASP), Cornell University April 25-26, 1985.

- 21.** Plowman, T.; Hensold, N. Names, Types, And Distribution of Neotropical Species of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae). *Brittonia* 2004, 56, 1–53. From reaseargate.
- 22.** Restrepo, D.A. Ernesto Saenz, Orlando Adolfo Jara-Muñoz, Iván F. Calixto-Botía, Sioly Rodríguez-Suárez, Pablo Zuleta, Benjamin G. Chavez, Juan A. Sanchez, John C. D’Auria. Review *Erythroxylum* in Focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked Genus. *Molecules* 2019, 24, 3788; doi:10.3390/molecules24203788.
- 23.** Rivier L. Analysis of alkaloids in leaves of cultivates *Erythroxylum* and characterization of alkaline substances use during coca chewing. *Journal of Ethnopharmacology*, 3 (1981) 313 -335.
- 24.** Rury, P.M. Systematic anatomy of *Erythroxylum* P. Browne: Practical and evolutionary implications Cultivated Cocas. *Journal of Ethnopharmacology*, 3 (1981) 229 – 263.
- 25.** Weil, A.T. The Therapeutic Value of Coca in Contemporary Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 3 (1981) 367 – 376.
- 26.** White, D.M.; Islam, M.B.; Mason-Gamer, R.J. Phylogenetic inference in section *Archerythroxylum* informs taxonomy, biogeography, and the domestication of coca (*Erythroxylum* species). *American Journal of Botany* 106(1): 1–12, 2019. doi:10.1002/ajb2.1224.
- 27.** Zanolari, B.; David Guilet, Andrew Marston, Emerson F. Queiroz, Marc, al de Q. Paulo, and Kurt Hostettmann. Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. *J. Nat. Prod.* 2003, 66, 497-502.



4.

LA QUÍMICA DE LA PLANTA DE COCA

“El verdadero signo de la inteligencia no es el conocimiento, sino la imaginación.”

Albert Einstein

4.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo nos introduciremos en la química de la planta de coca. Sin lugar a dudas *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense* son conocidas por el alcaloide cocaína, pero hay otros alcaloides que pertenecen a los núcleos de tropanos, pirrolidinas y piridinas que son sintetizados por las *Erythroxylum* además de una variedad de calisteginas, terpenoides y compuestos fenólicos (flavonoides, taninos y ácidos aromáticos). (Restrepo (2019), Conzelman (2016), Jenkins (1996))

A los fines de esta tesis nos centraremos en este capítulo en la biosíntesis y las propiedades fisicoquímicas de la cocaína, higrina, cuscohigrina, cinamoilcocaína, metilecgonina que serán completadas en el capítulo 5 y su obtención a partir de las hojas de coca, esto nos dará las bases para interpretar por qué la higrina y cuscohigrina no son co-extraídas con la cocaína en el proceso clandestino de obtención de clorhidrato de cocaína a partir de las hojas de coca y por qué la cinamoilcocaína es un indicador secundario de mascado de hojas de coca y no puede ser considerado en el mismo nivel que la higrina y cuscohigrina, además de la interrelación que existe entre ellas en la biosíntesis y su distribución en el arbusto de coca siendo su mayor concentración en la hoja de coca. Cómo se origina el “Paco” o “Basuco”, desechos de pasta base fumables en la producción ilegal de la cocaína será otro tema de interés, debido a que la población de consumo de coca fumable (“paco”) en la Argentina ha tenido un incremento importante en los últimos años,

por lo que comprobar que estos consumidores pueden ser también diferenciados por el empleo de los alcaloides pirrolidínicos propuestos: higrina y cuscohigrina es también uno de los objetivos de este estudio.

Todos estos compuestos tienen en común que son alcaloides. Está fuera del alcance de esta tesis explicar los mecanismos de acción de los alcaloides que se discutirán en este capítulo.

4.2 ALCALOIDES DERIVADOS DEL AMINOACIDO L-ORNITINA

La definición de qué es un alcaloide es compleja y según Aniszewski T. (2007) pueden darse definiciones desde el punto de vista de la biología, la medicina y la química todas ellas muy similares entre sí. La definición de Winterstein y Tier tal vez pueda resumir que es un alcaloide:

1. Compuesto con mayor o menor toxicidad, que actúa principalmente sobre el sistema nervioso central (SNC).
2. Son de carácter básico (por su estructura química, por eso su nombre de alcaloides y amargos al sabor)
3. Poseen un nitrógeno heterocíclico.
4. Son sintetizados a partir de aminoácidos o sus derivados inmediatos (procesos de transaminación).
5. Tienen una distribución limitada en la naturaleza.

Los alcaloides son solo ligeramente solubles en agua, pero soluble en etanol, benceno, éter y cloroformo esto es de importancia desde el punto de vista químico.

Los alcaloides se clasifican según la molécula precursora que les da origen.

Hay tres principales **grupos de alcaloides**:

1. Alcaloides verdaderos.
2. Protoalcaloides.
3. Pseudoalcaloides.

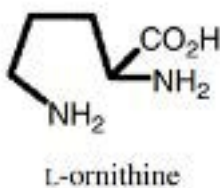
A los fines de esta tesis solo nos referiremos al grupo 1 (Alcaloides verdaderos).

Los **alcaloides verdaderos** según Aniszewski T. (2007):

- Derivan de aminoácidos y comparten un anillo heterocíclico con nitrógeno.
- Son sustancias altamente reactivas con actividad biológica incluso en dosis bajas.
- Tienen un sabor amargo y aparecen como un sólido blanco, con la excepción de la nicotina que es un líquido marrón.
- Forman sales solubles en agua. Además, la mayoría de ellos son sustancias cristalinas bien definidas que se unen con ácidos para formar sales.
- Pueden aparecer en plantas en un número limitado de especies y familias, y se los encuentra: en estado libre, como sales y como N-óxidos.
- Son aquellos compuestos en los que los aminoácidos descarboxilados se condensan con un resto estructural no nitrogenado.
- Los precursores primarios de alcaloides verdaderos son aminoácidos proteicos como: l-lisina, l-fenilalanina, l-tirosina, l-triptófano y l-histidina y aminoácidos no proteicos como la l-ornitina.

Como regla los aminoácidos proteicos, con sus precursores y post-cursores en diferentes vías, con o sin reacciones de transaminación, generalmente son sustratos para los alcaloides. La ornitina si bien es un aminoácido no proteico, su precursor es el l-glutamato (en plantas) y la l-arginina (en animales, en el ciclo de la urea), o sea la ornitina es el postcursor del aminoácido proteico l-glutamato (en plantas), por lo que cumple la regla de estar conectada a un aminoácido proteico.

Cocaína, higrina, cuscohigrina y cinnamoilcocaína pertenecen al grupo de los alcaloides verdaderos y son derivados del aminoácido l-ornitina.



En la *Erythroxylum coca* y *novogranatense* hay muchos alcaloides

derivados de la l-ornitina: cocaína, ecgonina, cinamoilcocaína, truxillinas, metilecgonina, tropina, higrina, hygrolina y cuscohigrina.

La síntesis de alcaloides a partir de la l-ornitina va a dar origen a tres grupos de alcaloides: **Tabla 4-1.**

- 1. Alcaloides de la pirrolidina o del pirrol.
- 2. Alcaloides del tropano.
- 3. Alcaloides de la pirrolizidina.




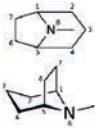







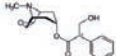
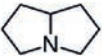
Tipo de alcaloide	Precursor	Grupo químico	Núcleo	Ejemplos
Alcaloide verdadero	L-ornitina	Alcaloides del pirrol	Pirrolidina 	Higrina  Cuscohigrina 
		Alcaloides del tropano	Tropano 	Cocaína  Metilecgonina  Tropococaína  Ecgonina  Anhidroecgonina metil ester  Cinamoilcocaína  Atropina/hiosciamina  Escopolamina 
		Alcaloides de la pirrolizidina	Pirrolizidina 	Europina Ilamina Meteloidina Homospermidina

Tabla 4-1: Alcaloides derivados de la L-ornitina.

A los efectos de esta tesis nos dedicaremos al camino de la biosíntesis de los alcaloides derivados de la pirrolidina y del tropano.

La l-ornitina da origen al núcleo C₄N que es el de las pirrolidinas del cual se originan la **HIGRINA Y CUSCOHIGRINA**. El núcleo C₄N está también contenido en el núcleo de los alcaloides del tropano como **COCAÍNA, METILECGONINA Y CINAMOILCOCAÍNA**.

Como se observa en la **Figura 4-1** se detalla el núcleo de estos alcaloides y ejemplos de los alcaloides que se sintetizan.

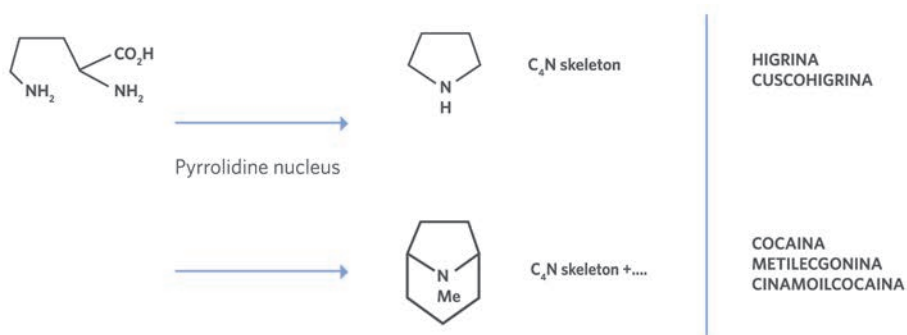


Figura 4-1: Origen del anillo pirrolidín y su inclusión en el anillo del tropano.

Los alcaloides de tropano consisten en más de 200 compuestos, Kohnen-Johannsen, K.L y col (2019) describen que los más importantes compuestos que contienen al núcleo del tropano son la cocaína (**Figura 4-2**), algunos otros son muy conocidos como la atropina y escopolamina y las calisteginas.

Las reacciones de esterificaciones e hidroxilaciones que dan origen a estos alcaloides a partir del núcleo del tropano, son reacciones que ocurren comúnmente en la naturaleza.

Los alcaloides que contienen el núcleo de la pirrolidina y tropano son muy activos biológicamente especialmente como neurotransmisor. La cocaína tiene efectos sobre zonas a nivel del sistema nervioso central, es un inhibidor de la recaptación de la norepinefrina, serotonina y dopa-

mina, también ejerce su acción sobre receptores colinérgicos muscarínicos.

Según Schmidt y col (2015) los efectos fisiológicos de estos compuestos se han atribuido a diversas características del esqueleto del tropano y sus sustituyentes. El átomo de nitrógeno metilado imita el de la acetilcolina y por lo tanto, conduce a la inhibición de los receptores de acetilcolina muscarínicos. La unión a los receptores de dopamina está mediada por la estereoquímica de los sustituyentes en las posiciones C-2 y C-3, siendo la afinidad más fuerte encontrada para estos compuestos los que contienen un anillo aromático conectado directa o indirectamente a la posición 3. Esto a su vez explica por qué la cocaína exhibe propiedades anestésicas y euforizantes.



Figura 4-2: Núcleo del tropano y cocaína.

Al igual que otros metabolitos secundarios de las plantas, los alcaloides de tropano tienen una distribución dispersa en las plantas angiospermas, se los reporta en siete familias, incluidas las Proteaceae, Convolvulaceae, Brassicaceae, Euphorbiaceae, Rhizophoraceae, Solanaceae además de las Erythroxylaceae a las cual pertenece la *E.coca* y *E. novogranatense*. Muchas de estas familias son taxonómicamente distantes la una de la otra. Por ejemplo, Erythroxylaceae y Solanaceae son miembros de clados completamente diferentes, y se cree que el último antepasado común vivió hace aproximadamente 120 millones de años.

La distribución desigual de los alcaloides tropanos en las angiospermas y las distancias evolutivas entre las familias que los sintetizan, sugieren dos hipótesis alternativas: ya sea la capacidad de producir alcaloides de tropano ha surgido independientemente en múltiples linajes

de plantas, o bien que el camino de la biosíntesis de los alcaloides del tropano estuvo presente en un ancestro común en las angiospermas y posteriormente se perdió. Determinar qué hipótesis es correcta puede ayudar a explicar por qué muchos otros grupos de metabolitos secundarios también tienen distribuciones dispersas entre las angiospermas. (Zuanazzi y col 2017).

4.3 BIOSÍNTESIS DE HIGRINA, CUSCOHIGRINA, COCAÍNA Y CINAMOILCOCAÍNA.

Los diferentes alcaloides que provienen del tropano (cocaína, escopolamina, hiosciamina, las calisteginas y otros) y de la pirrolidina (higrina y cuscohigrina) comparten un común precursor en sus síntesis que es el catión **N-metil- Δ^1 -pirrolinium**.

La biosíntesis de la higrina, cuscohigrina, cocaína y cinamoilcocaína se inicia con los aminoácidos ornitina y arginina. En las plantas la ornitina y arginina se forman a partir del glutamato.

Para formar **putrescina (Figura 4-3)** la ornitina es decarboxilada por la ornitindecarboxilasa (EC 4.1.1.17-ODC) (dependiente de piridoxal fosfato) y la arginina seguirá tres pasos: una decarboxilación a agmanina por la arginina decarboxilasa (EC 4.1.1.19 – ACD), luego una hidrólisis de la función imino por la agmanina deiminasa (EC 3.5.3.12 -AIH) y finalmente la hidrólisis de la urea que es catalizada por la N-carbamoylputrescina amidasa (EC 3.5.1.53- CPA). (Kohnen-Johannsen 2019).

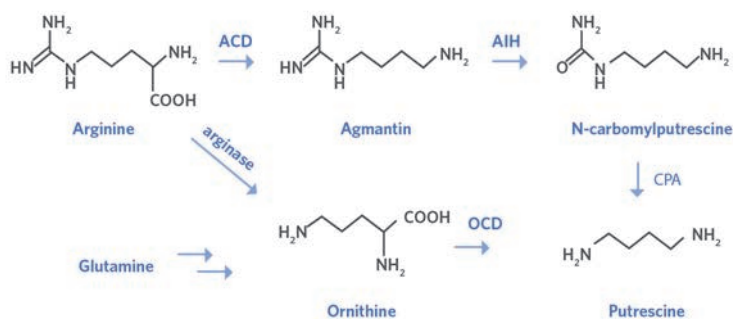


Figura 4-3: Formación de putrescina. (Kohnen-Johannsen 2019)

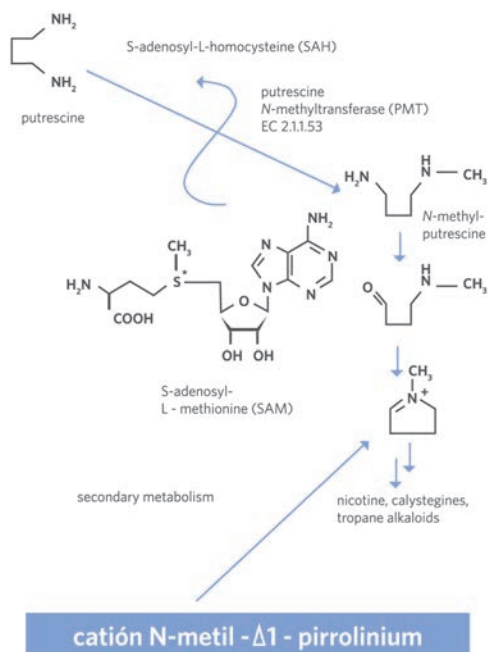


Figura 4-4: Formación del catión N-metil- Δ^1 -pirrolinium. (Kohnen-Johannsen 2019)

La putrescina (**Figura 4-4**) es metilada a N-metilputrescina por la S-Adenosilmetionina (SAME) y la putrescina N-metiltransferasa (Biastoff 2009), en esta reacción el sulfuro positivo de la SAM facilita la reacción nucleofílica del grupo amino de la putrescina. La N-metilputrescina por la actividad de la diamina oxidasa se convierte en N-metilamino butanal, el cual se cicla espontáneamente en el **catión N-metil- Δ^1 -pirrolinium** (en medio ácido, previo a la formación del 2-hidroxil-1-metilpirrolidina) **que dará origen al anillo de pirrolidina de la HIGRINA y de los alcaloides del tropano como cocaína, metilecgonina, cinamoilcocaína y a**

otros alcaloides como la nicotina y calisteginas.

4.3.1 Biosíntesis de higrina y cuscohigrina

A partir del catión N-metil- Δ^1 -pirrolinium con dos unidades de acetil CoA dará origen a la higrina y a partir de una segunda condensación de un nuevo anillo de pirrolinium se originaría la cuscohigrina. (Talapatra S.K. y col (2015)) (**Figura 4-5**)

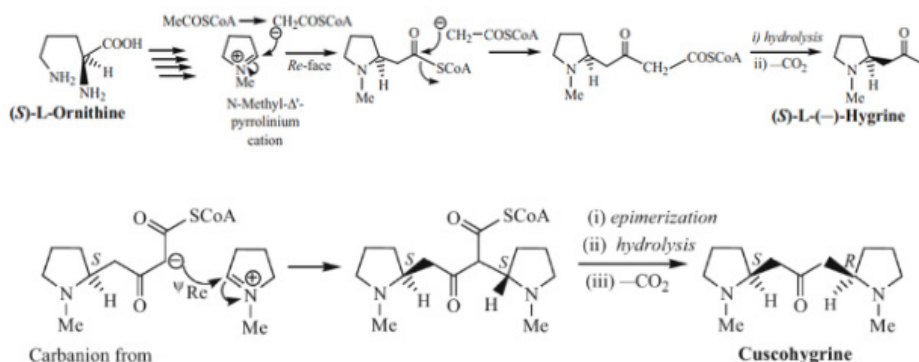


Figura 4-5: Biosíntesis de la higrina y de la cuscohigrina, a partir del carbanión que se forma previo a formar higrina (Talapatra S.K. y col. 2015)

Higrolina y pseudohigrolina alcaloides derivados del pirrol fueron también descritos en *Erythroxylum coca*. (Bath Ch. y col (2011)) (Figura 4-6)

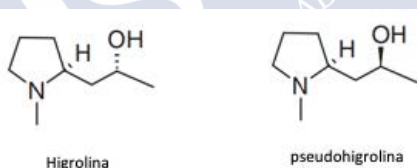


Figura 4-6: Estructura química de la higrolina y pseudohigrolina.

4.3.2 Biosíntesis de metilecgonina, cocaína y cinamoilcocaína.

Según Jirschitzka y col (2012) y Kohnen-Johannsen (2019) la formación del segundo anillo de los alcaloides del tropano está sujeta a discusión.

Una hipótesis (Figura 4-7) es que el catión N-metil- Δ¹-pirrolium (9) se condensa con acetoacetato (21) dando origen a higrina (23) y a un intermediario beta ceto éster (22) desde el cual se originaría la cocaína (17) (Leete 1991).

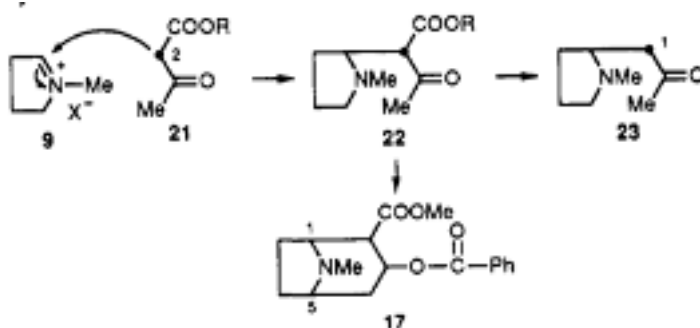


Figura 4-7: Formación de intermediario beta ceto éster (22) y cocaína (17). (Leete 1991)

La otra hipótesis (**Figura 4-8**) (Leete 1991), que sería la más probable en la que el catión **N-metil- Δ^1 -pirrolinium** reacciona con dos moléculas de acetil coenzima A (o malonil-CoA) para dar origen al ácido l-metil-2-pirrolidinil-3-oxobutanoico, luego al éster de la metilecgonona CoA que da lugar al 2-carbomethoxy-3- tropinona, una reducción estereoespecífica catalizada por la enzima metilecgonona reductasa (Me-cgoR) de este ceto éster da lugar a la **metilecgonina**. La metilecgonina es luego esterificada con benzoil-CoA para dar lugar a la **cocaína** y con la cinamoil-CoA a la **cinnamoilcocaína**, ambas aciltransferasas reacciones son catalizadas por la enzima cocaína sintetasa (Schmidt y col 2015).

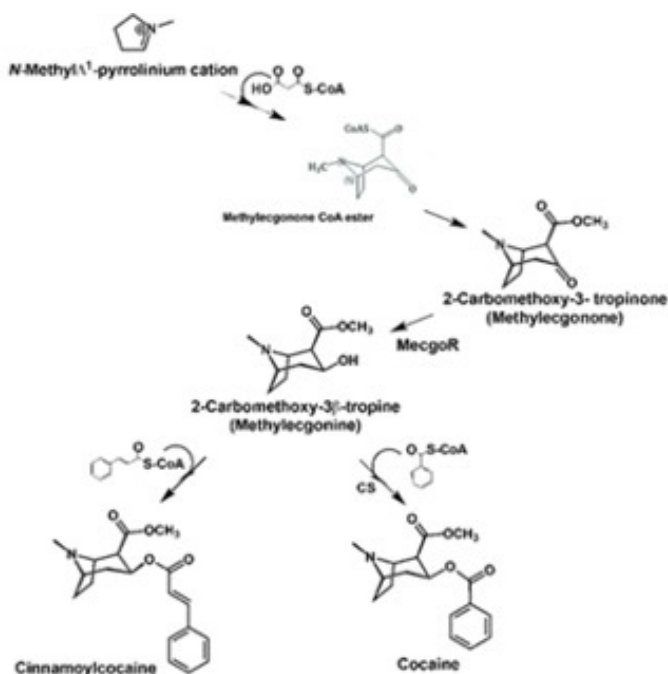


Figura 4-8: Biosíntesis de cocaína y cinamoilcocaína. (Leete 1991)

4.3.3 La tropinona punto en común en la síntesis de la higrina y cocaína.

La **Figura 4-9** (Giglioli-Givarc'h, N 2013) muestra la síntesis de higrina (un pirrolidin alcaloide) y de los tres mayores grupos de los alcaloides del tropano (cocaína, hiosciamina/escopolamina y calisteginas) a partir del catión **N-metil- Δ¹-pirrolinio**. A partir de higrina y del éster intermediario Ecgonona CoA (que da de origen a la metilecgonina y cocaína del género *Erythroxylum*) se forma un intermediario común la **tropinona**. La tropinona da origen a las calisteginas y a los alcaloides del tropano hiosciamina y escopolamina de la familia de las solanáceas (*Atropa belladonna*, *Datura stramonium*). La ruta biosintética del tropano en la coca difiere de la ruta en plantas solanáceas en que la descarboxilación en la posición 2 no ocurre y en su lugar el grupo carboxi se esterifica con metilo para formar 2-carboximetil-3-tropinona (metilecgonona). (Restrepo 2019)

La cuscohigrina que se origina a partir de la higrina es un importante alcaloide de la *Atropa Belladonna* (Baralle y col 1969) además de estar presente en la *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense*, en consecuencia, higrina y cuscohigrina son alcaloides presentes en especies distinta que la *Erythroxylum*.

Durante muchos años, se pensó que la higrina era un intermedio directo en la síntesis del tropano (basado en estudios de alimentación), pero estudios más recientes que usan isótopos estables demuestran que los resultados anteriores son debido a artefactos. (Restrepo 2019)

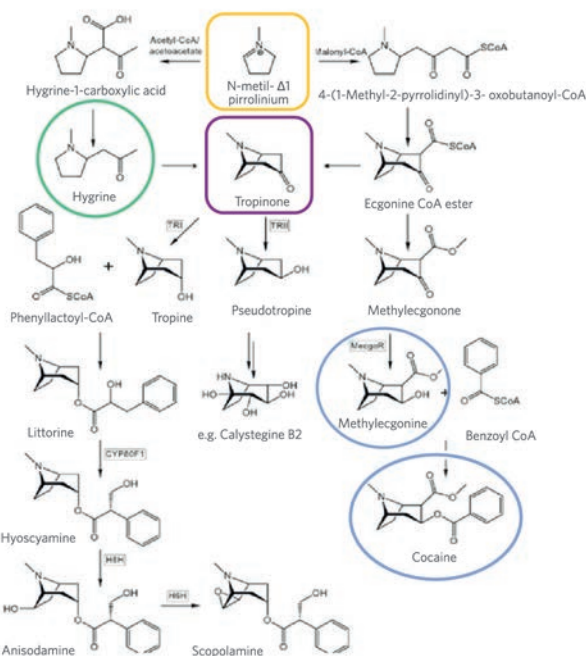


Figura 4-9: Biosíntesis de tropanona. (Giglioli-Givarc'h, N 2013)

4.4 CONTENIDO DE ALCALOIDES EN LA PLANTA DE ERYTHROXYLUM

Johnson (1996) realizó un estudio del contenido de alcaloides en diferentes partes de la *Erythroxylum coca* var *coca* en plantas que cul-

tivó en invernadero y concluyó que:

La fase juvenil de la *Erythroxylum coca* cultivada cerca de 39 ° 01' 54" N (latitud) 76 ° 55' 63" W (longitud) culminaba para dar inicio a la fase adulta después de 14 meses o 9 meses de crecimiento después de la germinación, cuando las hojas son cortadas debido a condiciones ambientales o eliminadas por el hombre. El corte de las hojas de *Erythroxylum coca* en condiciones de invernadero puede hacerse tres veces por año, pasando la planta del desarrollo vegetativo al reproductivo sucesivamente.

El análisis de las distintas partes de la flor abierta de *Erythroxylum coca* muestra que la concentración de cocaína es similar en todas ellas (**Tabla 4-2**). El perianto (pétalos y sépalos) tiene menor concentración de higrina, tropinona, metilecgonina, cinnamoilcocaína que las otras partes de la flor. La cuscohigrina no es detectable en ninguna parte de la flor analizada (Johnson 1996).



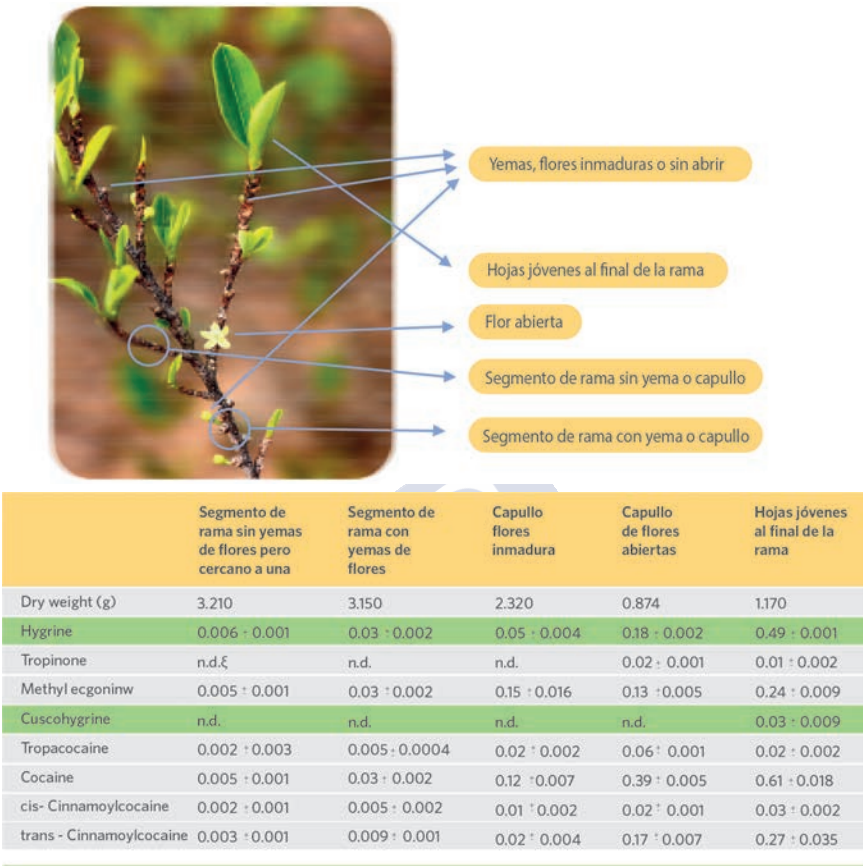
FLORES ABIERTAS				
	Pistilo	Pedicelo	Perianto	Estambres
Dry weight (g)	0.554	0.250	0.879	0.119
Hygrine	0.17 ± 0.002	0.22 ± 0.023	0.08 ± 0.001	0.16 ± 0.015
Tropinone	0.02 ± 0.004	0.02 ± 0.001	n.d.	0.04 ± 0.003
Methyl ecgonine	0.14 ± 0.007	0.14 ± 0.001	0.05 ± 0.001	0.08 ± 0.140
Cuscohygrine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tropacocaine	0.04 ± 0.001	0.03 ± 0.004	0.06 ± 0.003	0.01 ± 0.002
Cocaine	0.27 ± 0.003	0.32 ± 0.002	0.33 ± 0.001	0.32 ± 0.005
cis- Cinnamoylcocaine	0.04 ± 0.001	0.07 ± 0.001	0.02 ± 0.001	0.10 ± 0.006
trans - Cinnamoylcocaine	0.17 ± 0.002	0.21 ± 0.004	0.06 ± 0.002	0.06 ± 0.001

nd&: alcaloide no detectado
Concentración de alcaloide media de replicado de tres muestras. (% de peso seco de hoja)

Tabla 4-2: Concentración de alcaloides en la flor abierta de *Erythroxylum coca*.
(EMANUEL L. JOHNSON-Phytochemistry, Vol. 42, No. 1, pp. 35-38, 1996)

Las yemas florales inmaduras tenían un contenido de alcaloides más alto que los segmentos de rama con yemas florales en reposo y que las secciones de rama sin botones o yemas florales (Tabla 4-3). El bajo contenido de alcaloides en las secciones de las ramas adyacentes a las ramas que contienen yemas florales en reposo y yemas inmaduras (Tabla 4-3) puede indicar el transporte a las regiones de nuevo crecimiento, es decir, yemas florales, flores, yemas terminales y hojas jóvenes.

La cuscohygrina, es un alcaloide solo detectado en hojas jóvenes de *E. coca*. No se detectó en ninguna de las otras partes de la planta de coca analizadas (Johnson 1996).



Concentración de alcaloide media de replicado de tres muestras. (% de peso seco de hoja)

Tabla 4-3: Concentración de alcaloides en distintos estadios de desarrollo de *Erythroxylum coca*. (EMANUEL L. JOHNSON-Phytochemistry, Vol. 42, No. 1, pp. 35-38, 1996) (Modificada)

Johnson y col (1994) cuantificaron el contenido de cocaína, metilecgonina, higrina, tropinona, trans y cis cinnamoilcocaína, cuscohigrina, tropacocaína en el desarrollo de hojas de *E. coca* desde el brote hasta la semana 36 encontrando: **(TABLA 4-4)**

				
HOJAS DE COCA (%)				
Alcaloide	Brote	7 días	5 semanas	36 semanas
Cocaína	0,18	0,75	0,61	0,39
Metilecgonina	0,47	0,78	0,59	0,32
Higrina	0,19	1,8	0,68	0,2
Tropinona	0,11	0,33	0,08	<0,05
t-cinnamoilcocaína	0,19	3,9	0,31	> 1,75
c-cinamoilcocaína	0,06	0,06	0,55	~ 0,38
Cuscohigrina	0,23	1,97	0,52	0,25
Tropacocaína	0,05	0,12	0,05	<0,05

Concentración de alcaloide media de replicado de tres muestras. (% de peso seco de hoja)

Tabla 4-4: Contenido de alcaloides de la hoja de coca a distintos tiempos.
(JOHNSON E. et al Annals of Botany 73: 645-650, 1994)

El contenido de alcaloides de la hoja de coca de *Erythroxylum coca* va a depender del medio ambiente donde crece, de la forma en la cual es almacenada la hoja de coca y del método de extracción que se emplee. La hoja de coca cambia su color de un verde oscuro a dorado y finalmente amarillo, las hojas retienen clorofila hasta la semana 20 aproximadamente.

El mayor contenido de alcaloides de la hoja de *Erythroxylum coca* se halló a los 7 días cuando la hoja se encuentra todavía enrollada. Esto podría ser justificado por el efecto insecticida que le fue descrito a la cocaína y su aptitud de defensa en el momento más inofensivo de la hoja.

El contenido de cocaína fluctúa entre la semana 5 a la 9 (0,60%) y luego cae lentamente hasta valores de 0,39% en la semana 36. La metilecgonina sigue un patrón similar al de la cocaína, siendo esta un precursor necesario para la síntesis de la cocaína por benzoilación.

Higrina y cuscohigrina poseen concentraciones muy por encima de la cocaína hasta la semana 5, luego declinan su concentración lentamente hasta alcanzar valores cercanos a 0,2 % aproximadamente.

La tropinona y tropacocaína tiene sus valores más altos en las hojas de 7 días, luego de la semana 1 caen sin tener mayores fluctuaciones. Son los alcaloides de menor concentración en todo el proceso de desarrollo de la hoja

Trans-cinnamoilcocaína tiene su concentración mayor a los 7 días en la hoja de *E. coca*, luego fluctúa para hacer un pico en la semana 31, siendo su concentración muy por encima del resto de los alcaloides. La cis-cinnamoilcocaína a diferencia de los otros alcaloides tiene menor concentración en las hojas enrolladas que en hojas expandidas.

Johnson E.M. (1995) determinó que el contenido de alcaloides de la hoja de *E.coca* no era homogéneo y difería dependiendo del alcaloide: cocaína, metilecgonina e higrina fueron más altos en la periferia de la hoja de coca (0,48%; 0,46% y 0,32% respectivamente). Trans-cinnamoilcocaína fue más abundante en el pecíolo (0,24%). Cis-cinnamoilcocaína, tropinona, cuscohigrina y tropacocaína (0,14%; 0,004%; 0,16% y 0,04% respectivamente) se distribuían ubicuamente en la hoja.

Casale, J. y col. (1993) mencionaron que el contenido de alcaloides de *Erythroxylum coca* var. *coca* tiene un promedio de 0,8% de cocaína (rango 0,3% a 1,5%), 10% a 15% de trans y cis cinnamoilcocaína y 2% a 3% de truxilinas referidos a la cocaína. La *Erythroxylum coca* var. *ipadu* tiene menor concentración de cocaína que la var. *coca*, aproximadamente 0,25% y bajo porcentaje de cinnamoilcocaínas 2% referidos a la cocaína y no detectable cantidad de truxilinas. *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense* tiene un contenido similar en cocaína (media 0,8%) que la *Erythroxylum coca* var. *coca*, pero un mayor porcentaje de cinnamoilcocaína y truxilinas, en el rango de 40% a 60% referido a la cocaína. La *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* (cultivada en la zona noroeste de Perú) tiene un contenido similar de alcaloides que la *Erythroxylum novogranatense* var. *novogranatense*. La *Erythroxylum novogranatense* var. *truxillense* fue cultivada por mucho tiempo para ser utilizada en la fabricación de bebida gaseosa y por no tener un gusto amargo es también de elección para su mascado.

Penny M.E. y col (2019) reportaron el contenido de alcaloides de ocho muestras de *Erythroxylum coca* var. *coca* de diferentes regiones de

Perú e informa la presencia de anhidroecgonina metil ester en una concentración media de $0,02 \pm 0,01$ g/100 g de hoja seca. Anhidroecgonina metil ester también fue identificada por Jenkins, A.J y col (1996) en té de coca proveniente de Perú y Bolivia, el análisis de tazas de té preparada de un saquito de hojas de coca provenientes de Perú y Bolivia, encontraron, además: cocaína (el alcaloide mayoritario), benzoilecgonina, metilecgonina y trans-cinamoilcocaína. En ambos trabajos las mediciones de anhidroecgonina metil éster fueron realizadas por CG/MS. Zytowski E. (2018) reportó en cuatro (4) saquitos de té comercial y en cuatro (4) muestras de hojas de coca, concentraciones de AEME en un rango de 29-517 mg/100g y de 37-72 mg/100g respectivamente, empleando para su medición LCMSMS.

4.5 OBTENCION DE COCAÍNA A PARTIR DE LAS HOJAS DE ERYTHROXYLUM

Según Casale, J. y col. (1993) y United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC-2012) la forma de producción de cocaína ilícita tendría tres etapas:

1. Extracción (desde las hojas de coca a pasta de coca).
2. Purificación (de pasta de coca que pasa a coca base).
3. Conversión (de coca base a clorhidrato de cocaína).

Por ser un procedimiento clandestino, no hay un único método de obtención de la pasta de coca, base y clorhidrato de cocaína, hay una gran dispersión entre laboratorio y laboratorio en especial de los insumos químicos empleados, que varían tratando de adecuarse a los controles de químicos, los cambios de metodologías para abaratar los costos y, además, los diferentes pasos se realizan en distintos lugares separados la mayoría de las veces por largas distancias.

4.5.1. Obtención de la pasta de coca a partir de las hojas de coca.

Puede obtenerse por las técnicas de:

- a. Extracción por solventes- **Figura 4-10.**
- b. Extracción ácida- **Figura 4-11.**

a. La técnica de extracción por solventes es la “tradicional” en países como Perú, Colombia y Ecuador. Las hojas son cortadas y maceradas con agua y un compuesto alcalino para asegurarse la liberación de los alcaloides como la cocaína a base, luego se le agrega un solvente keroseno por ejemplo (el tipo de solvente empleado depende del costo y posibilidad de obtención), se deja en contacto a veces hasta 3 días, agitando (en forma manual o con mezcladoras de cemento) para favorecer la extracción de la cocaína. El solvente orgánico (keroseno) se separa y se descartan las hojas, **ESTE ES EL PUNTO CRITICO DONDE LA HIGRINA Y CUSCOHIGRINA NO ES EXTRAÍDA POR EL SOLVENTE, (en el capítulo 6, sección 6.3 se discutirá detalladamente este punto)**. Los alcaloides son extraídos del keroseno con una pequeña cantidad de ácido sulfúrico diluido⁸, quedando éstos retenidos en el medio acuosos en forma de sal, como el sulfato de cocaína, siendo luego precipitados a Pasta de Coca por la adición de una sustancia alcalina (carbonatos de sodio, potasio o calcio, hidróxido de sodio o potasio, amoníaco). El precipitado es aislado y secado, empaquetado y enviado a un laboratorio para seguir su procesamiento. Esta técnica da un rendimiento de cocaína entre 30% a 80%. **Figura 4-10.**

⁸El “agua rica” o “guarapo” se llama a la solución ácida que contiene sulfato de cocaína, es una solución amarillento-amarronada.

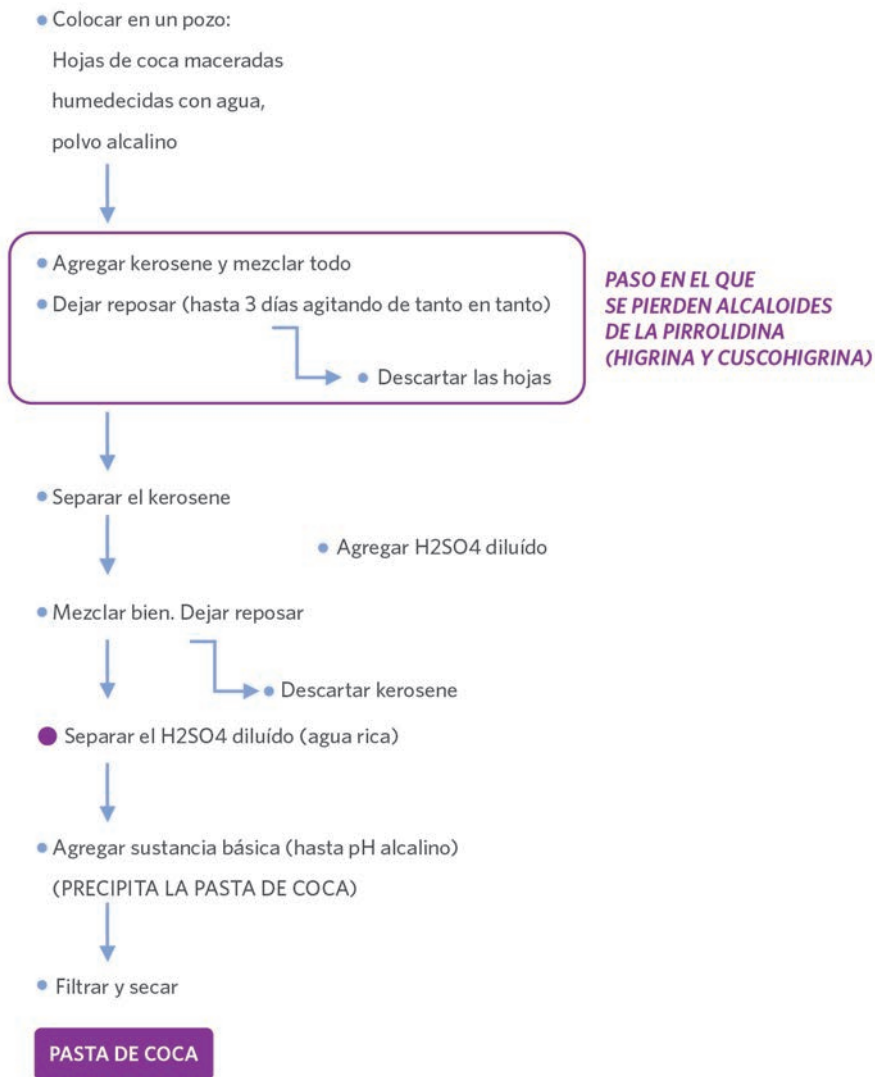


Figura 4-10: Producción ilícita de pasta de coca por la técnica de extracción con solvente.

b. En el método de extracción ácido las hojas son cubiertas con ácido sulfúrico diluido y pisadas fuertemente por trabajadores para extraer los alcaloides como sales, por ej. Sulfato de cocaína. El líquido

ácido es separado y precipitada la cocaína por agregado de una sustancia básica (queda la base libre) (punto final en general puede ser marcado por agregado de fenoftaleína), el precipitado es re-disuelto con keroseno, se agita y deja separar de la fase acuosa que se descarta. El keroseno sigue luego el mismo procedimiento que la técnica de extracción por solventes. **Figura 4-11.**

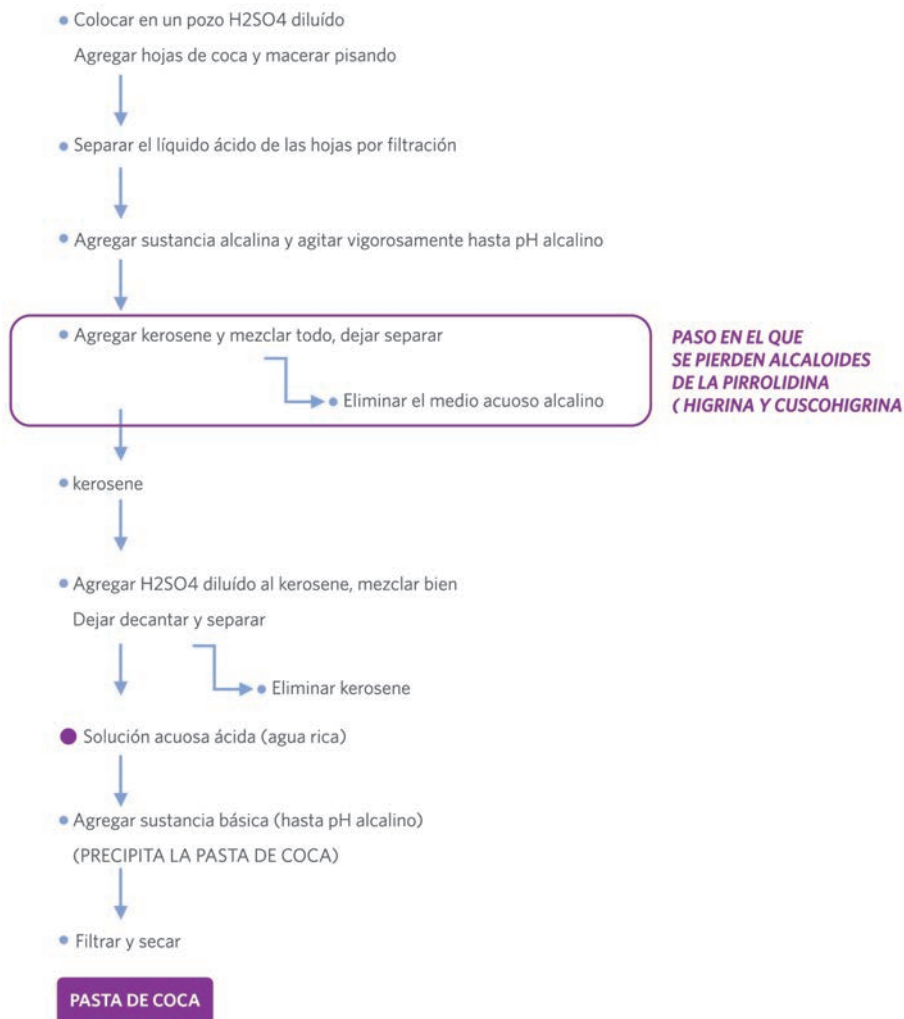


Figura 4-11: Producción ilícita de pasta de coca por la técnica de extracción ácida.

4.5.2 Obtención de la coca base a partir de la pasta de coca.

Este paso es de purificación, eliminará sales inorgánicas e impurezas de alcaloides que son co-extraídos con la cocaína, principalmente la cinamoilcocaína. Este paso resulta importante para obtener una cocaína de mejor calidad y color (más blanca). La cinamoilcocaína es escindida en este paso y se forman by-products solubles en agua que luego son eliminados.

La oxidación es una parte del procedimiento que reviste importancia para los objetivos de nuestra tesis de diferenciar el mascarador de hojas de coca del consumidor de cocaína, porque la cinamoilcocaína es propuesta como un marcador secundario en nuestros estudios, por lo que nos detendremos a detallar este paso de oxidación y mencionar los by-products que han podido ser detectados en el producto final que sale al mercado ilícito.

La pasta de coca (**Figura 4-12**) se disuelve en una pequeña cantidad de ácido sulfúrico diluido, se sube el pH con sustancias alcalinas (a pH neutro o ligeramente alcalino), el color de la solución es amarillo-amarronada, se le agrega gota a gota una solución concentrada de permanganato de potasio (color violeta), un fuerte oxidante, que precipita como dióxido de manganeso de color marrón-negro dejando la solución superior clara como indicativo de punto final. La solución se filtra para eliminar del MnO_2 y la solución resultante se agrega amoníaco que provoca la precipitación de coca base, se filtra, seca y empaca. La coca base tiene un porcentaje de cocaína de entre 80% a 95%.

❖ Otro camino más rápido en obtener coca base sin necesidad de pasar por la obtención de pasta de coca (que es inestable sino se procesa rápidamente) es partir del paso de la obtención de “agua ácida rica” recuperada de la extracción del kerosene, el pH es ajustado y se oxida con permanganato de potasio como se describió previamente. (**Figura 4-10 y 4-11**)

La etapa de la oxidación con permanganato de potasio es crítica porque si se agrega poco reactivo oxidante quedará cinamoilcocaína sin oxidar y si se agrega en exceso el agente oxidante, o el pH es poco controlado, la cocaína puede ser oxidada a N-formil cocaína y luego hidro-

lizada a N-norcocaína que por una reacción de transaminación puede pasar a N- benzoil norecgonina metil éster. Las impurezas encontradas en el clorhidrato de cocaína nos darán idea de la calidad de la técnica de oxidación empleada y de los compuestos empleados. Casals J.F. y col. (1998) describieron un nuevo by-products que proviene de la oxidación de la cinamoilcocaína en medio neutro o básico el dihidroxi-3-fenilpropionilecgonina metil éster.

Casals J.F. y col. (2008) describe el uso del etanol como sustituto del permanganato de potasio que es empleado con fines de purificación de la coca base y la aparición de una serie de by-products etilados: hexanoilecgonina etil éster; cocaetileno; cis-cinamoilecgonina etil éster; trans-cinamoilecgonina etil éster; 3',4',5'-trimetoxibenzoilecgonina etil éster; cis-3',4',5'-trimetoxicinamoilecgonina etil éster; y trans-3',4',5'-trimetoxicinamoilecgonina etil éster.

Casale J. y col, (2007) establecen el grado de oxidación dependiendo del contenido de cinamoilcocaína: las muestras que contienen menos del 2% de cinamoilcocaínas totales, en relación con cocaína, se consideran altamente oxidadas, muestras que contienen 2–6% de las cinamoilcocaínas se consideran moderadamente oxidadas, mientras que las muestras que contienen más del 6% de cinamoilcocaínas se consideran estar mínimamente o no oxidadas. A partir del 2005 Casals J.F. (2007) informa que más del 60% de muestras de secuestro analizadas evidencian un alto nivel de oxidación.

4.5.3 Obtención del clorhidrato de cocaína a partir de coca base.

La producción de clorhidrato de cocaína a partir de coca base se procesa en batch de 1kg pudiendo llegar a 5 kg y los solventes empleados pueden variar.

La coca base se disuelve en éter dietílico, si existen sustancias insolubles se separan, igual volumen de acetona con una cantidad estequiométrica de ácido clorhídrico concentrado es adicionada al éter dietílico con agitación, la formación del clorhidrato de cocaína da lugar a un precipitado blanco cristalino, el proceso se deja entre 3 a 6 horas para que se complete la cristalización. Posteriormente se filtra, se seca

bajo lámparas u hornos microondas, se empaqueta y se envía a los lugares de comercialización.

La relación de solventes éter etílico: acetona (1:1) es la más empleada pero debido a la dificultad en Sudamérica de obtener estos solventes se usan otros alternativos como: cloruro de metilo, tolueno, metil etil cetona, acetato de etilo etc. El porcentaje de pureza del clorhidrato de cocaína varía entre 80% a 97%. **Figura 4-13.**

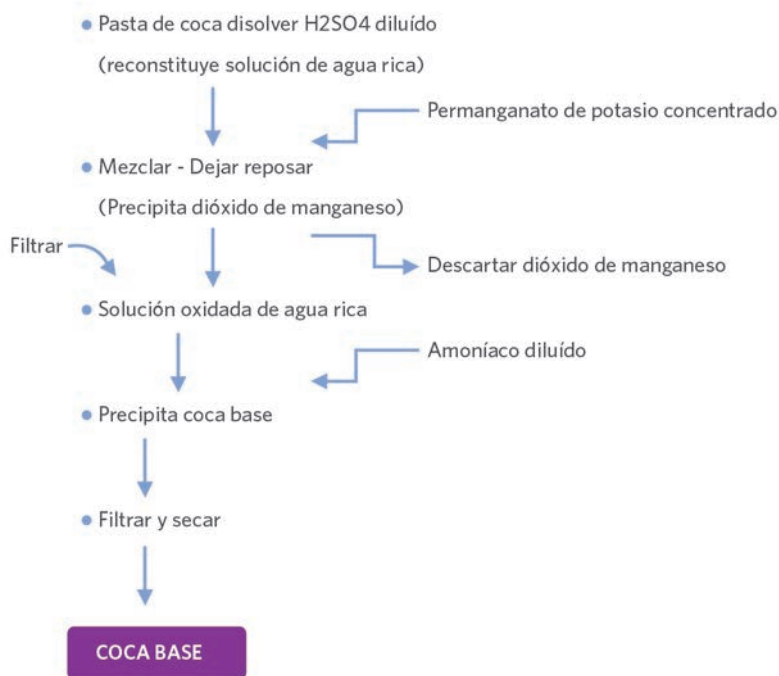


Figura 4-12: Producción ilícita de coca base a partir de pasta de coca.



Figura 4-13: Producción ilícita de clorhidrato de cocaína de coca base.

4.5.4 “PACO”, “BASUCO”, “PASTA BASE”

El “paco” (**P**asta + **c**ocaína) o base de cocaína en Argentina es conocida como “basuco” en Colombia, “pitillo” en Bolivia, “baserolo” en Ecuador, “pasta de coca” en Perú, “pasta base” o “base” en Chile y Uruguay (también se la conoce como “paco”), es el deshecho que se origina en la producción del clorhidrato de cocaína.

El “paco”, “basuco” o “pasta base” son cocaínas fumables al igual que el crack (se produce con posterioridad al clorhidrato de cocaína, es un producto de mayor pureza que los anteriores). Son definidas como sustancias volátiles y sublimables, dado que pueden pasar a fase gaseosa directamente desde la sólida. Son líquidas desde los 98 °C y su punto de ebullición está entre los 187 °C y 188 °C; la sal, el clorhidrato de cocaína, tiene un punto de fusión muy alto, lo que impide su sublimación, por lo tanto, no se puede fumar, pues **es destruida por el calor** (Castaño G.A. 2000). El “paco” o pasta base o sulfato de cocaína es un remanente entre la pasta base y la coca base, es un producto anterior al clorhidrato de cocaína, es barato y en general se suele dar de recompensa a quienes colaboran con la distribución de la droga o su manufactura, es altamente adictivo, con poco tiempo de consumo de PBC (pueden ser semanas o meses), a diferencia de la cocaína, se establece una dependencia severa difícil de tratar clínicamente. Hoy es un gran problema de salud pública en Argentina y otros países de la región, ataca principal-

mente a los jóvenes y adolescentes de las clases bajas, ocasionando un amplio espectro de conductas antisociales y delictivas, pudiendo el dependiente llegar a situaciones límite como matar para conseguir la droga. (UNODC-2013).

Casals J.F. y col 1993, explica que la obtención de la coca fumada o el “Basuco” en Colombia se obtiene en el procedimiento de extracción por solventes, cuando luego de agregado al kerosene una solución de ácido sulfúrico para extraer sulfato de cocaína, a la que luego se le adiciona una base precipitando pasta de coca, la cual es filtrada y la pasta de coca sólida es secada, la solución de ácido sulfúrico filtrada se le vuelve a agregar más base y algo de pasta base vuelve a precipitar, este residuo es el que es empleado para fumar, contiene impurezas como restos de solventes, carbonatos, cinamoilcocaína etc. Un segundo deshecho de coca base fumable suele quedar al pasar de coca base a clorhidrato de cocaína, a la acetona resultante luego de precipitar el clorhidrato de cocaína, le suele quedar coca base sin reaccionar, evaporada la acetona puede quedar un residuo que es empleado para fumar, más limpio que el primer deshecho obtenido de la obtención de la pasta base.

La composición de las cocas fumables es todavía objeto de estudio, pueden tener entre un 40 a 85% de sulfato de cocaína. (Castaño G.A. 2000).

La importancia de esta modalidad de consumo en esta tesis radica en que siendo el fumado del “paco” o la “pasta base” un producto cercano a las hojas de coca podría tener en su constitución química los dos alcaloides propuestos como marcadores higrina y cuscohigrina, si tiene como contaminante aún a la cinamoilcocaína. Como veremos en el **capítulo 6 sección 6.5.4** un grupo consumidor de “paco” en rehabilitación de la ciudad de Buenos Aires fue testeado para comprobar si aún en estos consumidores los alcaloides higrina y cuscohigrina propuestos como marcadores, siguen siendo de utilidad, en el análisis de pelo, en la diferenciación del mascador de hojas de coca del consumidor de cocaína en sus diferentes modalidades.

4.6. FORMAS DE CONSUMO DE COCAÍNA

Según UNODC-2013 las formas de consumo de cocaína se reflejan en la siguiente **Tabla 4-5**, en la que se muestra el tipo de sustancia con cocaína, su concentración, vías de administración, tiempo de aparición y duración de los efectos y probabilidad de dependencia, como se ve la hoja de coca en su modalidad mascado o infusión como té no presentaría dependencia, en el **capítulo 3, sección 3.6** la planta de coca se especificaron las bondades médicas que se le atribuyen.

TIPO DE SUSTANCIA COCAÍNICA	CONCENTRACIÓN DE COCAÍNA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	VELOCIDAD DE APARICIÓN DE LOS EFECTOS	DURACIÓN DE LOS EFECTOS	PROBABILIDADES DE DEPENDENCIA (de cada 100 que consuman)
Hoja de coca	0.5 - 15%	Infusión oral	Lenta	30 a 60 minutos	NO
Clorhidrato de cocaína	12 - 75%	Tópico, genital, intranasal	Relativamente lenta	30 a 60 minutos	Sí, a largo plazo
Clorhidrato de cocaína	12 - 75%	Parental, endovenosa, subcutánea, intramuscular	Rápida	10 a 20 minutos	Sí, a largo plazo
Pasta básica de cocaína	40 - 85% (sulfato de cocaína)	Fumada	Muy rápida	5 a 10 minutos	Sí, severa adicción a corto plazo
Cocaína base (Crack)	30 - 80% (alcaloide cocaína)	Inhalada, fumada	Extremadamente rápida	5 a 10 minutos	Sí, severa adicción a corto plazo

Tabla 4-5: Formas de consumo de cocaína.

Referencias

1. Aniszewski T. Alkaloids. Secrets of life. Alkaloid Chemistry, Biological significance, applications and ecological role. Definition, Typology and Occurrence of Alkaloids. Chapter 1. Elsevier. First edition 2007. <http://rushim.ru/books/rastenia/alkaloids-secrets-of-life.pdf>. (consultado febrero 2020).
2. Baralle, F.E; Grost, E.G. Biosynthesis of cuscohygrine in *Atropa Belladonna* from sodium acetate -1- 14C. *Phytochemistry*, 1969, Vol. 8, pp. 849 to 851.
3. Bhat, Ch.; Tilve, S.G. Synthesis of (-)-hygrine, (-)-norhygrine, (-)-pseudohygroline and (-)-hygroline via Nef reaction. *Tetrahedron Letters* 52 (2011) 6566–6568
4. Biastoff, S.; Brandt, W.; Dräger, B. Putrescine N-methyltransferase – The start for alkaloids. *Phytochemistry* 70 (2009) 1708–1718.
5. Casale, J.F.; Klein, R.F.X. Illicit Production of Cocaine. *Forensic Sci. Rev.* 1993, 5, 95.
6. Casale, J.F.; Hays, P.A.; Toske, S.G.; Berrier, A.L. Four New Illicit Cocaine Impurities from the Oxidation of Crude Cocaine Base: Formation and Characterization of the Diastereomeric 2,3-Dihydroxy-3-Phenylpropionylecgonine Methyl Esters from cis- and trans-Cinnamoylcocaine. *J Forensic Sci*, July 2007, Vol. 52, No. 4.
7. Casale, J.F.; Boudreau, D.K.; Jones, L.M. Tropane Ethyl Esters in Illicit Cocaine: Isolation, Detection, and Determination of New Manufacturing By-Products from the Clandestine Purification of Crude Cocaine Base with Ethanol. *J Forensic Sci*, May 2008, Vol. 53, No. 3.
8. Castaño, G.A. Cocaínas fumables en Latinoamérica. *ADICCIONES*, 2000 • VOL.12 NÚM. 4 • PÁGS. 541/550.
9. Conzelman, C. S; Dawson M White. The Botanical Science and Cultural Value of Coca Leaf in South America. Roadmaps to Regulation: Coca, Cocaine, and Derivatives Part I: Background - History & Overview of Use. Chapter · April 2016.
10. Docimo, T; Reichelt, M.; Schneider, B.; Kai, M.; Kunert, G; Gershenzon, J.; D'Auria, J.C. The first step in the biosynthesis of cocaine in *Erythroxylum coca*: the characterization of arginine and ornithine decarboxylases. *Plant Mol Biol* (2012) 78:599–615 DOI 10.1007/s11103-012-9886-1.
11. Giglioli-Givarc'h, N. New Light on Alkaloid Biosynthesis and Future Prospects. Academic Press Elsevier. 2013. https://books.google.com.ar/books?id=baP3IV_DdaAC&pg=PA39&lpg=PA39&dq=biogenesis+of+tropane+esters&source=bl&ots=kS-OC69uRf&sig=ACfU3U31lY-I_uWQJrXD3jUlnH3IJ12lx-

g&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiv7onOxtPnAhWKIbkGHRnNApM-Q6AEwDnoECAoQAQ#v=onepage&q=biogenesis%20of%20tropacocaine&f=false. Consultado Febrero 2020.

12. Jenkins, A.J.; Llosa, T.; Montoya, I.; Cone, E.J. Identification and quantitation of alkaloids in coca tea. *Forensic Science International* 77 (1996) 179- 189.

13. Johnson, E.L. Alkaloid Content in *Erythroxylum coca* tissue during reproductive development. *Phytochemistry*, Vol. 42, No. 1, pp. 35-38, 1996.

14. Johnson, E.L.; Emche, S.D. Variation of alkaloid content in *Erythroxylum coca* leaves from leaf bud to leaf drop. *Annals of Botany* 73: 645-650, 1994.

15. Johnson, E.L. Content and distribution of *Erythroxylum coca* leaves Alkaloids. *Annals of Botany* 76: 331-335, 1995.

16. Kim, N., Estrada, O.; Chavez, B., Stewart Jr., Ch.; D'Auria, J.C. Tropane and Granatane Alkaloid Biosynthesis: A Systematic Analysis. *Molecules* 2016, 21, 1510; doi:10.3390/molecules21111510

17. Kohnen-Johannsen, K.L.; Kayser, O. Review Tropane and Granatane Alkaloid Biosynthesis:

18. A Systematic Analysis. *Molecules* 2019, 24, 796; doi:10.3390/molecules24040796.

19. Leete, E.; Bjorklund, J.A.; Maria M. Couladis, M.M.; Sung Hoon Kim. Late Intermediates in the Biosynthesis of Cocaine: 44 1 -Methyl-2-pyrrolidinyl)-3-oxobutanoate and Methyl Ecgonine. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 9286-9292.

20. Oficina de la Naciones Unidas contra la droga y el delito UNODC. *Pasta Básica de Cocaína Cuatro décadas de historia, actualidad y desafíos*. 2013.

21. Penny, M.E.; Zavaleta, A.; Lemay, M.; Liria, M.R.; Huaylinas, M.L.; Alming, M.; McChesney, J.; Alcaraz, F.; M.B. Reddy, M.B. Can coca leaves contribute to improving the nutritional status of the Andean population? *Food and Nutrition Bulletin*, vol. 30, no. 3 © 2009, The United Nations University.

22. Restrepo, D.A. Ernesto Saenz, Orlando Adolfo Jara-Muñoz, Iván F. Calixto-Botía, Sioly Rodríguez-Suárez, Pablo Zuleta, Benjamin G. Chavez, Juan A. Sanchez, John C. D'Auria. Review *Erythroxylum* in Focus: An Interdisciplinary Review of an Overlooked Genus. *Molecules* 2019, 24, 3788; doi:10.3390/molecules24203788.

23. Talapatra, S.K. ; Talapatra, B. *Chemistry of plant natural products*. ISBN 978-3-642-45410-3 (e-book) ISBN 978-3-642-45409-7 ISBN 978-3-642-45410-3 (eBook) DOI 10.1007/978-3-642-45410-3 Springer Heidelberg New York Dordrecht London.

24. Schmidt, G. W.; Jirschitzka, J.; Porta, T.; Reichelt, M.; Luck, K.; Pardo Torre, J.C.; Dolke, F.; Varesio, E.; Hopfgartner, G.; Gershenzon, J.; D'Auria, J.Ch. The Last Step in Cocaine Biosynthesis Is Catalyzed by a BAHD Acyltransferase. *Plant Physiology*, January 2015, Vol. 167, pp. 89–101, www.plantphysiol.org. Downloaded from www.plantphysiol.org on February 3, 2015.

25. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials. UNODC, Vienna 2012.

26. Zuanazzi, J.A.S.; Trenea, V.; Limberger, R.P.; Sobral, M.; Henriques, A.T. The Alkaloids: Chemistry and Biology. *Biochem. Syst. Ecol.* 2001, 29, 819- First edition 2007. https://books.google.com.ar/books?id=_4BLb_xWVrgC&pg=PA94&lp=PA94&dq=J.+A.+S.+Zuanazzi,+V.+Trenea,+R.+P.+Limberger,+M.+Sobral,+A.+T.+Henriques,+Biochem.+Syst.+Ecol.+2001,+29,+819&source=bl&ots=iE3D6SQGZY&sig=ACfU3U1Vf57eAU8GBuQMILxp9bEntX-cgA&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjkp76boYTnAhVmFbkGHdN9AD-YQ6AEwAHoECAoQAQ#v=onepage&q=J.%20A.%20S.%20Zuanazzi%2C%20V.%20Trenea%2C%20R.%20P.%20Limberger%2C%20M.%20Sobral%2C%20A.%20T.%20Henriques%2C%20Biochem.%20Syst.%20Ecol.%202001%2C%2029%2C%20819&f=false (consultado febrero 2020).

27. Zytowski E. Detection of various coca alkaloids in coca leaves and human specimen to proof the consumption of natural coca products via LC-MS/MS. Research thesis. Charité Berlin Institute of Forensic Medicine Department of Forensic Toxicology. 2018





II-OBJETIVO DE LA TESIS





OBJETIVOS PRINCIPAL Y SECUNDARIOS DE LA TESIS

El consumo de la hoja de coca o de beber infusiones como el té de coca es una práctica legal y consolidada en la República Argentina a través de la Ley Federal 23737 (mod. Ley 26052 en 2005); mientras que, por el contrario, la tenencia y el consumo de cocaína está penalizado como ocurre en todos los países del mundo.



El mascado de hojas de coca o el consumo de té de coca en Argentina ha creado una problemática legal que hasta la fecha de escribir esta tesis no tenía solución. Las hojas de coca tienen cocaína que ingresa al organismo de quien la consume y en donde la molécula pierde su identidad de origen. Como diríamos en estos tiempos donde se habla tanto de la calidad de los laboratorios perdemos su trazabilidad, solo tendremos un resultado positivo en sangre, orina, pelo, fluido oral y otros fluidos y tejidos del cuerpo, pero nada

sabremos del origen legal o ilegal de esa cocaína. Visto de esta manera el artículo 15 de la ley 23.737 pasaba casi sin quererlo a legalizar en algún sentido, el uso de la cocaína. En manos de un abogado hábil sería posible dejar a un imputado en libertad por el beneficio de la duda o de evadir un control laboral de drogas simplemente por recurrir al: **“yo masco”**.

En los últimos tiempos algunas noticias periodísticas que han sido tapa en prácticamente todos los diarios de la Argentina ponen de relieve la importancia de la necesidad de dar solución a este tema que crea no solo en la Justicia la impotencia de no tener herramientas para su resolución, sino en la víctima la sensación de ser acusados y expuestos injustamente en los medios periodísticos como consumidores de cocaína con las consecuencias que esto les produce no solo laborales sino tam-

bién familiares. Al final se muestran algunas situaciones reales.

El tema de investigación de esta tesis pretende entonces dar solución, a un problema real y que complica a la Justicia y al mundo laboral, hallar un marcador/es que permitan hacer la diferencia entre mascadores de hoja de coca de consumidores de cocaína.

HIPOTESIS: es de suponer que la diferencia entre consumir hojas de coca y el producto final de la extracción de las hojas de coca que es la cocaína, esté dado porque en las hojas de coca hay una cantidad importante de compuestos que también deberían ingresar al organismo además de la cocaína, y que no están en el producto purificado de las hojas que es la cocaína, por lo que hallar alguno/s de ellos podría permitirnos hacer la diferencia.

El **objetivo principal** de esta tesis doctoral es:

-Discernir el origen legal o ilegal de un resultado positivo de cocaína en una muestra biológica.

Como **objetivos secundarios:**

- Validar métodos analíticos que permitan la determinación de cocaína, sus metabolitos como así también otros alcaloides de la hoja de coca en muestras biológicas (orina, pelo y fluido oral)

- Encontrar compuestos que permitan diferenciar el consumo de cocaína ilícita, del mascado de hojas y por tanto puedan llegar a considerarse marcadores específicos.

- Aplicar la metodología analítica desarrollada a muestras biológicas reales de consumidores de cocaína y mascadores de hoja de coca, para poder establecer la efectividad de los marcadores encontrados.

- Finalmente conocer el perfil farmacocinético de la cocaína y alguno de sus metabolitos (benzoilecgonina y cuscohigrina) en mascadores de hoja de coca.

Se entiende que las publicaciones presentadas cumplen cada una por sí misma con cada uno de los objetivos principal y secundarios planteados, es difícil adjudicar una publicación a un objetivo. Como al final de la tesis detallo en el apartado: “Conclusiones y Propuesta”

se dieron respuesta casi en su totalidad a estos objetivos y la hipótesis planteada resultó ser comprobada, pero surgieron como es lógico en una investigación nuevas dudas y caminos de investigación.

Algunos ejemplos:

Viernes 30 de septiembre de 2016



Uno de los cuatro choferes al que le dio positivo el test, afirmó que iban mascando hojas de coca:
"no soy un drogado"

Viernes 30 de septiembre de 2016 un chofer de ómnibus de pasajeros de larga distancia que conducía a jóvenes estudiantes en su viaje de egresados fue sometido a un control de drogas de abuso, dio positivo para cocaína en orina lo que obligó a las autoridades a detenerlo.

El chofer así hacía su defensa:

“Tienen que haber aclarado que era hojas de coca. No tiene que haber puesto que dio positivo el test porque nos drogamos. Eso es feo para una familia, que tus hijos piensen eso, que sos un drogado. Y yo no soy un drogado”.

El chofer explicó que masca coca **“por costumbre”** y porque **“es algo que entretiene porque vas viajando solo”**.

Asimismo, contó que también le ponen hojas de coca al mate, algo que usan **“los colectiveros, los camioneros, todos”**.

Lunes 1º de octubre de 2018



Un viaje escolar se retrasó porque seis choferes dieron positivo al control de drogas.

El 1ero de octubre de 2018 seis choferes de micros dieron positivo un test de orientación en saliva para cocaína. El ómnibus iba a transportar escolares en un viaje a una ciudad balnearia.

Los choferes todos del noroeste argentino, donde la práctica del mascado es común, así defendían el resultado positivo a cocaína:

“...los conductores salteños aseguraron que sólo mascaron hojas de coca”

La Comisión Nacional de Regulación del Transporte explicaba: **“...que el aparato con el que se hacen los controles se centra en la sustancia en sí y “no puede discriminar si se trata de hojas de coca o de cocaína””**.

sábado 8 de febrero de 2020



Detuvieron a dos choferes de un micro que viajaba de Mar del Plata a Retiro por consumir cocaína.

El micro al costado de la ruta. El sábado 8 de febrero de 2020 un micro de pasajeros fue detenido en la ruta a raíz de la denuncia que sus pasajeros hicieron al 911 al observar las maniobras en zigzag del chofer del colectivo. Los choferes dieron positivo el test de orientación para cocaína.

La defensa que hacían desde la empresa fue la siguiente:

“...aseguran que sus conductores no consumieron sustancias prohibidas y que por lo tanto “consideran de vital importancia esperar los resultados concluyentes de las contrapruebas a fin de conocer con certeza los hechos sucedidos””, “...en más de una oportunidad, los aparatos de medición de narcóticos arrojan falsos positivos debido a su incapacidad de distinguir entre el uso de una sustancia no narcótica, inofensiva y legal como la hoja de coca”.





III-METODOLOGÍA

Capítulo 5





5.

5. TIPO DE MUESTRAS- PREPARACION DE MUESTRAS- TECNICAS INSTRUMENTALES

“Poco conocimiento hace que las personas se sientan orgullosas. Mucho conocimiento, que se sientan humildes.”

Leonardo da Vinci

5.1 INTRODUCCION

En este capítulo describiremos las muestras sobre las cuales se realizaron los estudios, tanto biológicas como no biológicas. La preparación de muestras explicando las ventajas y desventajas de los procedimientos de preparación de muestras empleados: extracción líquido-líquido, precipitación de proteínas, extracción en fase estacionaria (SPE) y dilución-inyección. En la medida de lo posible se hará una explicación fisicoquímica del porqué los métodos de preparación de muestras empleados cumplieron con los objetivos planteados de extraer además de la cocaína y sus metabolitos otros alcaloides como higrina, cuscohigrina y cinamoilcocaína y lograr un extracto que fue apto para su análisis instrumental. El concepto de **Log P (Kow)** o la solubilidad de un compuesto en octanol/agua será tratado para explicar junto con el pKa y pKb el diferente comportamiento de la higrina y cuscohigrina con el resto de los alcaloides de la hoja de coca usualmente analizados tanto en las muestras biológicas como no biológicas, estas diferencias son la que justifican la utilización de la higrina y cuscohigrina como marcadores para diferenciar el consumo legal de hojas de coca del ilegal de cocaína. Este punto del análisis será una de las etapas a mejorar, con el empleo de técnicas con las que se obtengan extractos más limpios redundando

en el aumento de la sensibilidad y en la disminución del efecto matriz por otro lado. El mecanismo de incorporación de drogas al pelo será detallado para tratar de interpretar el ingreso de la higrina y cuscohigrina a esa matriz, al igual del por qué la cuscohigrina permanecería por más tiempo en el fluido oral que la cocaína y las posibles razones de no poderla detectar en las muestras de plasma.

La toma de muestras fue realizada siguiendo la normativa ética y legal aplicable en cada uno de los laboratorios en los cuales se procesó el material.

De las técnicas instrumentales empleadas muchas forman parte de la rutina de trabajo de los laboratorios de toxicología, por lo que no se hará una descripción de sus principios y funcionamientos por considerarlo estar fuera de los objetivos de esta tesis, si nos detendremos a explicar aquellos aspectos que nos permitieron ir obteniendo resultados y conclusiones en nuestros trabajos como por ejemplo los espectros de masa obtenidos en el analizador de masa simple cuadrupolo con una fuente de ionización al vacío de impacto electrónico de 70 eV acoplado a cromatografía gaseosa (CGMS), el comportamiento de la columna cromatográfica polar HILIC (en los equipos de cromatografía líquida) por qué fue empleada en lugar de las tradicionales columnas de fase reversa y como las condiciones cromatográficas afectaron el comportamiento de los compuestos investigados. El índice de Kovacs será brevemente explicado como parámetro de identificación, al igual que las posibles causas del efecto matriz en las muestras inyectadas en un cromatógrafo líquido triple cuadrupolo o Liquid Chromatography–tandem mass spectrometry (LCMSMS), la importancia de un cromatógrafo líquido masa híbrido single cuadrupolo con analizador de tiempo de vuelo o Liquid Chromatography–Quadrupole-Time Of Flight Mass spectrometry (LC-QTOF-MS) en la identificación de dos metabolitos de la cuscohigrina y de la higrina será comentada.

5.2 LAS MUESTRAS

En la **Tabla 5-1:** Se muestra un resumen de las muestras biológicas y no biológicas analizadas, las sustancias investigadas, métodos de prepa-

ración de muestras y equipamiento usado en la identificación y cuantificación.

PAPER/POSTER	TRABAJO	TIPO DE MUESTRA	COMPUESTOS INVESTIGADOS (límites de detección y/o cuantificación)	EXTRACCION	IDENTIFICACIÓN	OTRAS MUESTRAS
ORINA						
Paper	Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing? Forensic Science International 227 (2013) 60–63	2 mascaradores de hoja de coca/3 voluntarios mascaradores de hojas de coca	Cocaína (0.010 ug/mL) Metilecgonina (0.000 ug/mL) Hygrina Cuscohygrina	Líquido-líquido Metilbutiléter en medio alcalino	CG-MS	Muestras de secuestro: 20 Italia 5 España 5 Argentina Total: 30 muestras analizadas
Paper	Application of hygrine and cuscohygrine as biomarkers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. Forensic Science International 243 (2014) 30–34	24 mascaradores de hoja de coca 38 consumidores de cocaína Total: 62 muestras analizadas	Cocaína (0.010 ug/mL) Metilecgonina (0.000 ug/mL) Cinnamoylcocaína Hygrina Cuscohygrina (0.000 ug/mL)	Líquido-líquido Metilbutiléter en medio alcalino	CG-MS	
Poster	Determinación en orina por UHPLC-MS/MS de dos nuevos mascaradores para diferenciar el consumo de hojas de coca del consumidor de cocaína TIAFT- 9 no Congreso Regional Latinoamericano - 4 al 8 de noviembre de 2013- Uruguay-cases. Forensic Science International 243 (2014) 30–34	22 mascaradores hoja de coca 20 consumidores de cocaína de España Total:42 muestras analizadas	Cocaína (0.0025 ug/mL) Metilecgonina, benzoilecgonina, Ecgonina (0.001 ug/mL) Cuscohygrina (0.010 ug/mL) Hygrina	Diluir-inyectar	LC-MS/MS	
Paper	The probability to detect cocaine, methylcgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after 24 years. Microchemical Journal 151 (2019) 104215	15 mascaradores de hoja de coca. Total: 15 muestras analizadas	Cocaína (50 ng/mL) (5ng/mL) Metilecgonina Cinnamoylcocaína (50 ng/mL) Hygrina (qualitative) (5ng/mL) Cuscohygrina (200 ng/mL) (50 ng/mL) (CGMS) (LCMSMS)	Líquido-líquido Metilbutiléter en medio alcalino	LC-MSMS y CG-MS	

Tabla 5-1: Detalle del tipo de muestras, compuestos investigados, métodos de extracción e identificación de los trabajos publicados.

PAPER/POSTER	TRABAJO	TIPO DE MUESTRA	COMPUESTOS INVESTIGADOS (límites de detección y/o cuantificación)	EXTRACCIÓN	IDENTIFICACIÓN	OTRAS MUESTRAS
			FLUIDO ORAL			
Paper	Development of a Reliable Method for Assessing Coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC-MS-MS		(Límite de cuantificación) Cocaína (0,005 ug/mL) Benzoilecgonina (0,005 ug/mL) Cocaetileno (0,005 ug/mL) Tropococaína (0,005 ug/mL) Cinamolcocaína (0,005 ug/mL) Metilecgonina (0,010 ug/mL) Anhidrometilecgonina (0,010 ug/mL) Cuscohigrina (0,050 ug/mL) Higrina	Precipitación de proteínas con acetnitrilo.	LC-MSMS	
	Journal of Analytical Toxicology, 2018;1-7 doi: 10.1093/jat/bky076					
Paper	Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar	5 consumidores de cocaína de España 1 mascador de hojas de coca (12 muestras analizadas)	(Límite de cuantificación) Cocaína (0,005 ug/mL) Benzoilecgonina (0,005 ug/mL) Cocaetileno (0,005 ug/mL) Tropococaína (0,005 ug/mL) Cinamolcocaína (0,005 ug/mL) Metilecgonina (0,010 ug/mL) Anhidrometilecgonina (0,010 ug/mL) Cuscohigrina (0,050 ug/mL) Higrina			
	Acta Toxicol. Argent. (2019) 27 (2):72-80	1 bebedor de té de coca (6 muestras analizadas) Total: 23 muestras analizadas				

Tabla 5-1: Detalle del tipo de muestras, compuestos investigados, métodos de extracción e identificación de los trabajos publicados.

PAPER/POSTER	TRABAJO	TIPO DE MUESTRA	COMPUESTOS INVESTIGADOS (límites de detección)	EXTRACCIÓN	IDENTIFICACIÓN	OTRAS MUESTRAS
PLASMA						
Paper	No publicado	1 mascarador de hoja de coca. (19 muestras analizadas de plasma) (xx muestras analizadas de orina)	Cocaína (0.010 ug/mL) Benzoilecgonina (0.010 ug/mL) Cuscohigrina (0.010 ug/mL)	SPE-Strata™-X 33 x m Polymeric Sorbent	CG-MS	Hojas de coca (LC-MSMS) (2 muestras analizadas)
OBTENCIÓN DE PASTA BASE DE COCA DESDE HOJAS DE COCA						
Paper	Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse Drug Test. Analysis (2016)	Extracción por solventes (7 muestras analizadas)	Cocaína Metilecgonina Tropococaína Cinamilo cocaína Cuscohigrina Higrina	Disolver-inyectar	LC-MSMS y CG-MS	
Poster	La eliminación de la higrina y cuscohigrina en las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascaradores de hoja de coca de consumidores de cocaína. TIAFT- PERU- noviembre 2015	Extracción por solventes (4 muestras analizadas)	Cocaína Metilecgonina Tropococaína Cinamilo cocaína Cuscohigrina Higrina	Disolver-inyectar	CG-MSMS	

Tabla 5-1: Detalle del tipo de muestras, compuestos investigados, métodos de extracción e identificación de los trabajos publicados.

PAPER/POSTER	TRABAJO	TIPO DE MUESTRA	COMPUESTOS INVESTIGADOS (límites de detección y/o cuantificación)	EXTRACCIÓN	IDENTIFICACIÓN	OTRAS MUESTRAS
			PELO			
Paper	Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios Int J Legal Med 2015 Jan(129(1):69-84.	26 mascaradores de hoja de coca. (28 segmentos analizados) 22 consumidores de cocaína de Alemania. (33 segmentos analizados) Total: 61 muestras analizadas	Cocaína 0.02 ng/mg Norococaína 0.48 ng/mg Metilecgonina 0.04 ng/mg Benzoilecgonina 0.02 ng/mg Tropococaína 0.5 ng/mg Cocaetileno 0.02 ng/mg Cinnamoylcocaina 0.03 ng/mg Cuscohigrina 0.97 ng/mg Higrina	Lavado/líquido-líquido	LC-MSMS y LC-QTOF-MS	2 hojas de coca
Paper	Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco" (coca paste) by hair analysis: A preliminary study of possibilities and limitation. Forensic Science International 297 (2019) 171-176	10 moderados/ocasionales mascaradores de hoja de coca/bebedores de té de coca 20 fumadores de pasta base ("Paco") 8 consumidores de cocaína Alemana Total: 38 muestras analizadas	Cocaína 0.02 ng/mg Norococaína 0.48 ng/mg Metilecgonina 0.04 ng/mg Benzoilecgonina 0.02 ng/mg Tropococaína 0.5 ng/mg Anhídrometilecgonina 0.1 ng/mg Cocaetileno 0.02 ng/mg Cinnamoylcocaina 0.03 ng/mg Cuscohigrina 0.97 ng/mg Higrina	Lavado/líquido-líquido	LC-MSMS	4 hojas de coca 4 bolsitas té de coca comercial Total: 8 muestras analizadas
Poster	Can the use of alkaline substance during chewing coca leaves change the distribution of alkaloids of cocaine in hair? TIAFT-Buenos Aires 2014	26 mascaradores de hoja de coca. (28 segmentos analizados) 22 consumidores de cocaína de Alemania. (33 segmentos analizados) Total: 61 muestras analizadas	Cocaína 0.02 ng/mg Norococaína 0.48 ng/mg Metilecgonina 0.04 ng/mg Benzoilecgonina 0.02 ng/mg Tropococaína 0.5 ng/mg Cocaetileno 0.02 ng/mg Cinnamoylcocaina 0.03 ng/mg Cuscohigrina 0.97 ng/mg Higrina	Lavado/líquido-líquido	LC-MSMS	

Tabla 5-1: Detalle del tipo de muestras, compuestos investigados, métodos de extracción e identificación de los trabajos publicados.

5.2.1 Muestras biológicas de origen humano

De las ventajas y desventajas de cada una de estas muestras en la toxicología forense mucho se ha escrito, desde sus ventajas de detección hasta su utilidad para establecer el tiempo de consumo, todas ellas revisten importancia en la investigación forense y laboral. Estos puntos serán brevemente revisados en cada apartado donde se trate el detalle de las muestras biológicas. Siendo **la higrina y la cuscohigrina dos compuestos que no tienen antecedentes de estudio en muestras biológicas de origen humano** se intentará dar una explicación en lo referente a su comportamiento desde la preparación de las muestras hasta el análisis instrumental, remarcando las diferencias fisicoquímicas de la higrina y cuscohigrina con la cocaína, que hacen precisamente las razones de ser considerados dos marcadores de consumo de hoja de coca.

Las muestras biológicas de origen humano analizadas fueron:

- ❖ Orina.
- ❖ Pelo.
- ❖ Fluido oral.
- ❖ Plasma

5.2.1.1 Consideraciones éticas y legales en la toma de muestras para estudio.

Todas las muestras biológicas de los mascadores de hoja de coca y consumidores de cocaína analizadas fueron tomadas con el consentimiento informado por escrito de los participantes y siguiendo legales requerimientos.

Los grupos analizados fueron:

- ❖ Mascadores de coca del noroeste argentino pertenecientes a la provincia de Salta. En el mapa de la Argentina, en verde, la provincia de Salta. (Figura 5-1)
- ❖ Pacientes de un instituto de rehabilitación de consumo de drogas de la ciudad de Buenos Aires (Argentina). (Punto rojo en el mapa). (Figura 5-1).
- ❖ Profesionales consumidores aleatorios de hojas de coca y té de coca que viven en la ciudad de Buenos Aires. (Punto rojo en el mapa).

(Figura 5-1).

- Voluntarios que aceptaron consumir hojas de coca o té de coca , en general pertenecientes al staff del laboratorio.
- Muestras de consumidores de drogas provenientes de causas Judiciales de España y Alemania.

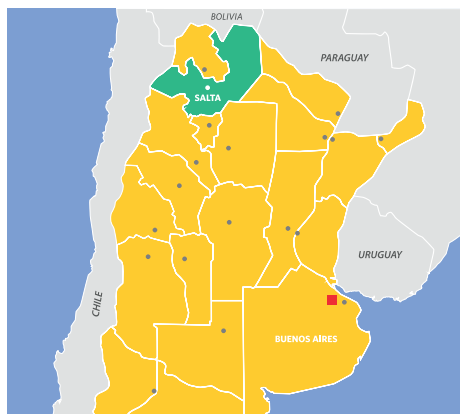


Figura 5-1: Mapa de la Argentina. Marcado en verde Provincia de Salta y en rojo la ciudad de Buenos Aires.

Anexo 1: Se adjunta el modelo del consentimiento que fue firmado por los participantes (de la toma de muestras de orina y pelo) y la encuesta que se les realizó al grupo de personas que mascan hojas de coca de la provincia de Salta, ubicada en el noroeste argentino.

Con el resto de las muestras de origen forense se siguieron los recaudos éticos requeridos.

Ninguna de las prácticas llevadas a cabo con los voluntarios significó riesgo para el participante.

5.2.1.2 Muestras biológicas de origen vegetal y no biológicas.

- Hojas de coca.
- Té de coca.
- Muestras de secuestro.
- Muestras de las distintas etapas de la producción clandestina de cocaína.

SECCIÓN 1

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS



5.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

La preparación de la muestra es un paso previo indispensable antes de realizar un análisis instrumental. Fundamentalmente lo que se intenta es separar el o los analitos de interés de la matriz (que interfieren con el análisis) o bien diluir la muestra de tal manera que la matriz no interfiera con las técnicas cromatográfica. Esto requiere del conocimiento de las características fisicoquímicas de los analitos a estudiar; de su estabilidad, cuánto tiempo puede permanecer en una determinada matriz sin sufrir procesos de degradación o transformación; de los parámetros farmacocinéticos de ese analito/s que nos permitirían seleccionar la muestra biológica que sea conveniente y la preparación de la muestra adecuada para poder ser inyectada y analizada cromatográficamente como así también seleccionar las condiciones instrumentales (temperatura, columnas, fases móviles etc.) que nos aseguren la detección del o los compuestos.

Con una adecuada preparación de muestras tendremos extractos más limpios lo que mejorará la cromatografía, límites de detección inferiores, disminuirá la variabilidad entre ensayos lo que significa método más robusto, menor efecto matriz al remover fosfolípidos, proteínas, sales, ácidos nucleicos, azúcares etc., menor reanálisis o la posibilidad de falsos negativos o positivos, mayor vida útil de la columna y menor mantenimiento de equipos.

En nuestro caso buscábamos algún/os compuestos que nos pudiera/n ser útiles al objetivo de nuestro estudio, un marcador/es que nos sirva/n para diferenciar el uso legal de la hoja de coca del uso ilegal de la cocaína. Si era evidente que, de los muchos compuestos de la hoja de coca, la mayoría son eliminados en el proceso de la producción del clorhidrato de cocaína, pero que durante el mascado de la hoja de coca podíamos suponer que muchos ingresarían a través de la mucosa oral y el tubo digestivo a nuestro organismo, estábamos ante un proceso que en toxicología forense se conoce como “búsqueda de desconocido” o “general unknown”

Fernández-Peralbo y col (2012) sugieren cuando se procede a la búsqueda de un compuesto/s desconocidos (untargeted analysis) que el

método de preparación de la muestra debe ser:

- no selectivo;
- simple y rápido con el mínimo número de pasos;
- reproducible.
- y que se adecue a la disponibilidad analítica del laboratorio.

En la **Tabla 5-2** se resumen las ventajas y desventajas de las preparaciones de muestras biológicas empleadas más frecuentemente.

POSIBILIDADES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Técnica	Ventajas	Desventajas	Matrices apropiadas	
Dilución	Simple. Económico. Fácil de automatizar.	No cleanup. No concentra. No selectivo.	Orina	
Precipitación de Proteínas	Simple. Rápido. Mínimo desarrollo de método.	Selectividad baja. Baja remoción de interferencias de la matriz. No concentra. Puede ser necesario evaporar el solvente.	Sangre entera, plasma suero, fluido oral.	
Extracción líquido-líquido	Mejor clean up que la precipitación de proteínas. Se puede optimizar para distinta clase de compuestos.	Menos selectivo que SPE. No remueve fosfolípidos endógenos. Requiere intervención del técnico. Difícil de automatizar. No es ideal para drogas polares y metabolitos. Necesita evaporación de solventes.	Orina, plasma, suero, fluido oral.	
Placas elimina lípidos/proteínas	Simple. Método universal. Rápido. Mínimo desarrollo de método.	Selectividad baja. No concentra. Puede ser necesario evaporar el solvente.	Sangre entera, plasma suero	
Extracción en fase sólida (SPE)	Mejor opción de cleanup. Rápido, fácil de automatizar. Alta recuperación y reproducibilidad. Permite desarrollo para optimizar recuperación y cleanup. Variedad de productos y opciones.	Puede requerir desarrollo de método y optimización del protocolo. Se percibe ser más difícil y costoso.	Orina, sangre entera, plasma, suero, fluido oral.	

No selectivo

Altamente selectivo

Presentación Waters [®], modificado

Tabla 5-2: Posibilidades para la preparación de muestras biológicas.

5.3.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE ORINA

5.3.1.1 Generalidades

La muestra de **orina** es de elección en toxicología forense para realizar estudios de screening y de investigación como describen Fernández-Peralbo y col (2012) y Niu Z. y col (2018). Las ventajas de la orina es que es una matriz compuesta por un 95% de agua, más sodio, amonio, fosfatos, sulfatos, urea, creatinina, proteínas y productos procesados por el riñón y el hígado. Tiene un pH ligeramente ácido a la mañana (pH 6,5-7,0), a la tarde alcalino (pH 7,5 a 8,0) en sujetos sanos, por supuesto la alimentación puede hacer que varíe el pH. La matriz acuosa es lo que le da a la orina su ventaja en la preparación de la muestra, comparada con el suero que tiene 60 a 80 g/L de proteínas, la orina está en el orden de 0,5 a 1 g/L, el filtrado glomerular hace que el contenido de lípidos y otras moléculas de alta peso molecular no lleguen a la orina o en muy baja cantidad, por lo que es de esperar menor efecto matriz que suele ser un inconveniente al momento de la preparación de las muestras para su posterior uso cromatográfico.

Por otro lado, la fácil obtención de la muestra de orina que no requiere de procedimientos invasivos y la posibilidad de obtener grandes volúmenes de muestra que permiten repetir los análisis y hacer modificaciones analíticas. Además contiene drogas y metabolitos en altas concentraciones comparado con otros fluidos del cuerpo; todo esto hace a la orina una muestra de elección para iniciar la investigación de nuestro estudio. Debemos agregar que es la muestra de uso de rutina en caso de controles laborales y de búsqueda de drogas de abuso en causas judiciales.

En nuestros trabajos dos son los métodos de preparación de muestras en orina empleados previamente a su inyección en equipos de cromatografía:

- **Método de extracción líquido-líquido.**
- **Método dilución- inyección (dilute-and-shoot).**

5.3.1.2. Método de extracción líquido-líquido

5.3.1.2.1 Consideraciones del método de extracción líquido-líquido.

El método utilizado en nuestro laboratorio cumplía con los requisitos sugeridos por Fernández-Peralbo y col (2012), por lo que seguimos empleando la técnica de extracción líquido-líquido en orina, de uso de rutina en el laboratorio, una alcalinización a pH ~9 con un tampón carbonato/bicarbonato y el empleo del *metil-terbutil éter* como solvente de extracción y así obtuvimos los primeros resultados en orina hallando a dos alcaloides derivados de la **pirrolidina la higrina y cuscohigrina** constituyentes de la hoja de coca.

Analizando el método empleado a partir de la obtención de los resultados obtenidos y teniendo ya el dato de la característica fisicoquímica de los marcadores y que ambos son alcaloides derivados de la pirrolidina podemos justificar su hallazgo desde el punto de vista químico:

El procedimiento de extracción líquido-líquido de alcaloides se basa en la diferente solubilidad de las sales de alcaloides en comparación con la base libre, al basificar la muestra de orina a pH ~9 las bases libres de los alcaloides son transferidas al solvente (metil-terbutil éter) inmiscible con la matriz acuosa de la orina, el solvente es elegido teniendo en cuenta el Log Pow (coeficiente de partición octanol/agua). Además, la extracción líquido-líquido es un procedimiento rápido, económico y eficiente y es empleado especialmente para muestras con bajo contenido de proteínas como la orina. (TIAFT-Bulletin XLI - Number 2)

El Log Pow (coeficiente de partición octanol/agua) representa la relación de un compuesto (no ionizado) entre dos fases, una de las fases es el octanol y la otra es el agua, se describe por la siguiente fórmula:

$$K_{ow} = \frac{[solute]_{octanol}}{[solute]_{water}}$$

El coeficiente de partición octanol/agua es expresado en forma logarítmica (base 10) como **Log Kow** o **Log P**. Es un parámetro obtenido en forma experimental o por técnicas de estimación o usando programas

computacionales. S= soluto; o= octanol; w= agua.

$$\log P_{o/w} = \log \frac{[S]_o}{[S]_w}$$

El valor Log Pow es definido para la forma neutra del compuesto (no ionizada) por lo tanto es necesario medir la lipofilicidad a un pH que asegure que el compuesto está en forma neutra, comúnmente el valor de pH se mide hasta dos unidades por debajo del valor de pKa para los ácidos y dos unidades para arriba para las bases. (Amezqueta, S. 2020)

El Log P o Kow describe el carácter polar o hidrofóbico de un compuesto, según su distribución entre *octanol / agua*. Valores positivos de Log Kow indican algún carácter hidrofóbico, la hidrofobicidad va aumentando a valores mayores. Compuestos o solventes con bajo o valores negativos de Log Pow indican polaridad. (Moldoveanu S. y col 2015)

Los valores de Log Pow pueden ir entre +10 muy hidrofóbico y -3 muy hidrofílico.

La solubilidad de los compuestos tiene relación con los valores de Log Pow, basado en el concepto que lo similar disuelve lo similar, se puede concluir que una extracción es más eficiente cuando uno de los solventes (o el solvente de extracción) y el soluto tienen similares valores de Log Pow y que la otra fase tenga valores de log Pow diferentes. En el caso de extraer varios compuestos simultáneamente lo ideal es tener un valor del solvente de extracción de Log Pow intermedio entre todos ellos. (Moldoveanu S. y col 2015).

En datos extraídos de Drager B. (2002), PubChem, DrugBank, Clarke (2004) y UNODC (2012) encontramos algunas de las características fisicoquímicas de los compuestos investigados que son mostradas en la **Tabla 5-3**.

ALCALOIDE	CAS-número	Peso molecular	Constante de disociación	Solubilidad	Log Pow
(2R,3S)-Cocaína	50-36-2	303,35	pK _a 5,4	CHCl ₃ , éter, EtOH ms H ₂ O ls pH4, ps pH 10	3,079+/-0,384 (Drager) 2,28 (ChemAxon) 2,3 (Clarke) Promedio 2,6
(2R,3S)-Cocaína clorhidrato	53-21-4		pK _a 8,6	H ₂ O, EtOH (caliente) ms	
(2R,3S)-Ecgonina metil ester	7943-09-1	199,25	pK _a 4,4+/- 0,20 pK _a 9,5 *	H ₂ O ms pH8, s pH 10, MEOH ms	-0,232+/-0,371 (Drager)
(2R,3S)-Ecgonina	481-37-8	185,22	pK _a 2,6+/- 0,40 pK _a 2,8; 11,1	H ₂ O ms pH10	-0,596+/-0,366 (Drager) -3,1 (ChemAxon) -3,8 (Clarke) Promedio -2,5
Higrina	496-49-1	141,21	pK _a 4,2+/- 0,20 pK _a 9,8*	H ₂ O ms pH8, s pH10	0,282 +/- 0,269 (Drager)
Cuscohigrina	454-14-8	224,34	pK _a 4,0+/- 0,20 pK _a 9,8 *	H ₂ O ms pH8, ls pH10	0,722 +/- 0,247
Benzoilecgonina	519-09-5	289,33	pK _a 3,15 (ácido) pK _a 9,54 (base)		-0,3* -0,59 (ChemAxon) -1,3 (Clarke) Promedio -0,73
Cinamoilcocaína	521-67-5	329,4		CHCl ₃ , éter, EtOH ms H ₂ O ps	2,7
Anhidro ecgonina metil ester	43021-26-7	181,23			1,1
Tropacocaína	537-26-9	245,3	pK _a 4,32	CHCl ₃ , éter, EtOH ms	2,607
MTBE	1634-04-4	88,15	pK _a 9,69	H ₂ O s (42g/L)	0,94

ms, muy soluble, >1 M; s, soluble, 0,1 M > 1 M; ls, leve soluble, 0,01 M > 0,1 M; ps, poco soluble, < 0,01 M.
Log Pow: Calculated octanol-water partition coefficient.

*calculado

MTBE: metil terbutil éter.

Tabla 5-3: CAS, PM, Constante de disociación, solubilidad y Log Pow de algunos alcaloides y solvente.

5.3.1.2.2. Discusión de los resultados de la extracción líquido-líquido.

En la **Tabla 5-3** se observa que la cocaína es un alcaloide más hidrofóbico que la higrina y cuscohigrina por su mayor valor de Log Pow de 2,6 (promedio), 0,282 y 0,722 respectivamente. Esto indica que la relación entre solvente orgánico: agua para la cocaína es 398: 1; para la higrina 2:1 y para la cuscohigrina 5:1 aproximadamente. (Las relaciones se obtienen sacando el antilog. de los Log Pow)

La metilecgonina, benzoilecgonina y ecgonina son metabolitos de la cocaína, (la metilecgonina es además un alcaloide de la hoja de coca) y como es de esperar por ser compuestos originados de la metabolización son más hidrofílicos como así lo indican sus Log P menores a los de la

cocaína. La relación entre la fase orgánica: agua es 0,6:1 para la metilecgonina, 0,2:1 para la benzoilecgonina y 0,003:1 para la ecgonina.

Los otros dos alcaloides la cinamoilcocaína y la anhidroecgonina-metilester (también se origina por pirólisis en el inyector del cromatógrafo gaseoso) son hidrofóbicos y al igual que la cocaína extraíble por solventes orgánicos. La distribución de la cinamoilcocaína entre octanol: agua es 500:1 y de la anhidroecgonina-metilester 13:1.

El solvente empleado metilterbutil éter (MTBE) **resultó ser en esta primera fase de la investigación adecuado para extraer a estos dos alcaloides de la hoja de coca: higrina y cuscohigrina** que como veremos a través de todos nuestros procesos experimentales **resultaron ser buenos marcadores para el principal objetivo de esta tesis de diferenciar al mascador de hoja de coca del consumidor ilegal de cocaína.**

El MTBE es un éter poco polar por su valor de Log P de 0,9, inmisible con el agua, difícilmente forma emulsiones y fácilmente eliminable por evaporación dado que su punto de ebullición es 55,2 °C dejando un residuo limpio para su inyección, previa redisolución y posterior inyección en el equipo de CGMS. La benzoilecgonina y ecgonina no son extraídas por el MTBE son moléculas zwitterion (poseen en la misma molécula un grupo carboxilo ácido y un grupo amino básico) y compuestos polares (Log P negativos)

5.3.1.3. Método dilución- inyección (dilute-and-shoot)

El empleo instrumental de la cromatografía líquida y la alta sensibilidad de los equipos LCMSMS o LC-QTOF-MS, permiten inyectar la muestra previo a hacer una simple dilución y pasar por filtro de 0,2 micras, generalmente se emplea para diluir la fase móvil en la relación inicial del gradiente empleado en el LCMSMS o LCQTOFMS, este es un método rápido, simple y económico. Por supuesto el empleo de esta forma de preparar la muestra va a depender de la eficiente ionización del analito y de la matriz sobre la cual estamos trabajando por la alta cantidad de interferencias propias de la muestra que además del ruido nos producirá un efecto matriz que influenciará en los resultados de nuestro

análisis y en la concentración del analito en la muestra. Algunos compuestos requieren un mayor grado de sensibilidad en su detección y esto obliga a una preparación de la muestra y posterior concentración del analito de interés en el extracto; hay algunas drogas que se eliminan conjugadas requieren de un paso previo, de una hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa, seguida de una extracción líquido-líquido o con SPE (Balcells, G. 2016).

En los análisis de muestras de orina de consumidores de hojas de coca y consumidores de cocaína **las concentraciones de nuestros analitos de interés (cocaína, benzoilecgonina, metilecgonina, higrina, cusco-higrina) se encuentran en el orden de los microgramos por mililitro muy por encima de los límites de detección de los LCMSMS (nanogramos/mililitro), por lo que una preparación de muestra por el método de dilución-inyección fue perfectamente válida y además permitió realizar diluciones 1/40 por lo que el efecto de la matriz fue casi nulo.**

5.3.2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE PELO

5.3.2.1. Generalidades.

El pelo es una muestra biológica de las considerados duras, es una matriz fuerte y estable a temperatura ambiente, fácil de manipular y transportar, su recolección es no invasiva y altamente resistente a la descomposición postmortem. Está constituido por 65 a 95% de proteínas, 1 a 9% de lípidos, 0,1 a 5% de pigmentos (melanina), pequeñas cantidades de elementos trazas, polisacáridos y agua. El pelo se sintetiza a partir del folículo piloso. La melanina es un pigmento que se produce en los melanocitos, células ubicadas en el ápex de la papilla dermal, en organelas llamadas melanosomas, el pigmento se va incorporando al pelo a medida que crece desde el bulbo. (Kintz P. 2007).

Es especialmente útil para proporcionar información a largo plazo sobre el **consumo / ingestión de drogas**, después de su eliminación del organismo. Las drogas son relativamente estables en el pelo. Suponiendo que el cabello crece aproximadamente 1 cm por mes, el análisis segmentario de los mechones de cabello permite la determinación del

patrón cronológico del uso de drogas. Las muestras de cabello son recogidas de la zona posterior del vertex de la cabeza, cercanas al cuero cabelludo, es una zona asociada a la menor variación de crecimiento. Se extrae un mechón de cabello del grosor de un lápiz lo importante es que sea suficiente muestra para hacer repeticiones. (Cooper G. y col 2012)

No todas las drogas se incorporan al pelo en igual magnitud y el gran inconveniente en el análisis del pelo es la posible contaminación externa (humo, contacto físico, productos químicos etc.).

La Sociedad de Pruebas de Cabello (SoHT) y Administración de Servicios de Salud Mental y Abuso de Sustancias (SAMHSA) elaboró un conjunto de recomendaciones (análisis de lavado, identificación de metabolitos, valores de corte) para ser útiles para una interpretación adecuada de los resultados. (Cooper y col 2012).

5.3.2.2. Aplicación del concepto del mecanismo de incorporación de drogas al pelo a la higrina, cuscohigrina y cinamoilcocaína.

Los mecanismos por los cuales las drogas se incorporan al pelo no son aún claros. Tres factores influenciarían el ingreso: el contenido de melanina del pelo y la lipofilidad y basicidad de la droga. (Pragst F. y col 2006); (Vogliardi, S. y col 2015) (Kintz P. y col 2007).

El principio farmacológico de distribución de drogas es el que rige para la penetración de las drogas al pelo desde la sangre. Los compuestos lipofílicos atravesarán fácilmente las barreras plasmáticas siguiendo un gradiente de distribución de concentración, no así los compuestos ionizados. Las drogas básicas o ácidas que estarán o no protonadas dependiendo del pH del medio y del pKa del compuesto podrán atravesar la membrana siguiendo el esquema que se muestra en la **Figura 5-2**. Los queratinocitos y melanocitos tienen un pH más ácido que el plasma. Se ha encontrado que el melanocito (célula productora de melanina) tiene un **pH entre 3 y 5**, por lo que compuestos básicos serán atrapados uniéndose a la melanina y se acumularán una vez ingresados. Por lo tanto, **sustancias lipofílicas y básicas se acumularán en la matriz del pelo.**

De acuerdo a los principios explicados previamente era de esperar que la higrina y cuscohigrina serían retenidas en la matriz del pelo, lo

que fue corroborado en los análisis de pelo que realizamos sobre mas-
cadores de hojas de coca y bebedores de té de coca aplicando los con-
ceptos mencionados:

- Higrina y cuscohigrina son por definición alcaloides, lo que ya in-
dica que son compuestos básicos débiles. Las constantes de disociación
que se muestran en la **Tabla 5-3**, son una medida de la fuerza de una
base débil. A mayor valor de pK_b menor será la basicidad de un com-
puesto. Los valores de pK_b para la higrina y cuscohigrina son similares
e inferiores al de la cocaína, por lo que es de esperar una basicidad de la
higrina y cuscohigrina algo mayor que la de la cocaína.

- El pK_a de las muestras en estudio higrina y cuscohigrina es aproxi-
madamente 9,8 por lo que al valor del pH del plasma (7,4) estarán pro-
tonadas y su ingreso al pelo podría seguir el principio de la protonación/
desprotonación, favorecido por el gradiente de pH. Como son bases
débiles están parcialmente disociadas y la forma neutra o sin carga de la
droga será la especie química que atraviesa la membrana y queda atra-
pada en el medio ácido del pigmento, corriendo la reacción hacia la
derecha y obligando a más droga a ingresar al pelo. **Figura 5-2.**

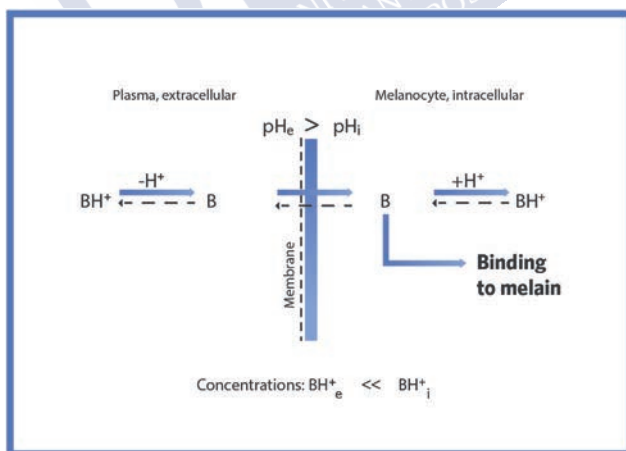


Figura 5-2: Incorporación de una droga básica al pelo. El pH menor en el mel-
anocito produce la acumulación de la droga en el pigmento del pelo.
e= extracelular; i= intracelular; BH+droga básica protonada; B=droga básica
neutra. (Pragst F. 2006)

La cinamoilcocaína es también un alcaloide y además lipofílico, para lo que valen los mismos conceptos mencionados anteriormente y era de esperar por lo tanto su ingreso a la matriz del pelo.

5.3.2.3. Etapas previas a la extracción de la/s droga/s del pelo.

Los procesos de extracción en matrices complejas como sangre, pelo o tejido representan un gran desafío para el analista por el alto número de interferencias de las muestras biológicas.

Antes de iniciar la preparación de la muestra de pelo se debe hacer una observación y medida del largo y del color del cabello y anotar otras particularidades como si el cabello ha sufrido tratamientos químicos como teñido, oxigenación etc. Posteriormente, como se muestra en la Figura 5-3, se inicia la preparación de la muestra con la segmentación (la segmentación se hace dependiendo de los objetivos del estudio); el lavado del cabello para eliminar la contaminación externa; el cortado o pulverización del pelo, para homogenizarla; la extracción y eventualmente un clean-up, finalizando con el análisis cuali/cuantitativo y la interpretación del resultado.



Figura 5-3: Etapas del procesamiento del pelo.

5.3.2.3.1. Lavado o descontaminación del pelo.

El lavado del pelo es un paso necesario para eliminar contaminación ambiental como polvo depositado en el cabello, sudor, sebo, productos cosméticos que pueden causar ruido de fondo, pero además para una correcta interpretación de los resultados analíticos es necesario distinguir entre la contaminación externa del pelo por droga de la verdadera ingesta de ésta. O sea, distinguir la contaminación pasiva del pelo del verdadero consumo activo del individuo lo que requiere un análisis de los lavados, que nos permitirá determinar si hubo una incorporación sistémica de la droga al pelo, al igual que realizar la determinación de metabolitos en el pelo que deberán estar en una proporción específica con respecto a la sustancia original como evidencia de que ha ocurrido una ingesta.

Los solventes próticos y no próticos empleados para el lavado del pelo son varios, y la discusión que existe es si los mismos facilitan o no la extracción de la droga ingerida por la persona además de descontaminar la superficie del pelo. Los más empleados son el agua, acetona y diclorometano. El agua como veremos, produce un hinchamiento de las fibras del pelo que facilitan la extracción de la droga atrapada en éste, por lo cual los lavados con agua deben ser rápidos, por otro lado, el agua es el líquido que rutinariamente usamos en la limpieza de nuestro cabello.

5.3.2.3.2. Consideraciones previas del método de preparación de las muestras de pelo empleado en nuestros análisis.

Según Pragst F. y col (2006), las drogas deben ser extraídas de la matriz del pelo por solubilización o digestión dado que no existen métodos directos de analizar las drogas en el pelo. Comúnmente se usan solventes para la extracción de drogas como metanol, metanol en medio básico o ácido, o soluciones buffers, hidróxido de sodio en medio acuoso, mezcla de solventes. Menos empleados son la digestión enzimática del pelo, o el uso de urea o tioglicolato. La elección del solvente para el método de extracción es un punto crítico en el análisis de pelos

Vogliardi, S y col. (2015) mencionan que para poder tener una me-

jor recuperación de las sustancias retenidas por el pelo, es un requisito previo esencial que el cabello se hinche, sea con agua u otros solventes hidrofílicos como el metanol. El metanol si bien es un solvente universal ampliamente usado en la extracción de drogas del pelo tiene el inconveniente que sus extractos son sucios, contaminado por los constituyentes del pelo siendo luego contraproducente al ser analizados instrumentalmente. El acetonitrilo no es tan efectivo como el agua para provocar la hinchazón de las fibras del pelo (Tillman W. y col 1961). Madry M.M. y col (2018) hicieron una comparación con diferentes solventes de extracción y hallaron que el acetonitrilo comparándolo con el metanol tiene baja eficiencia de extracción, de aproximadamente 35%- 37% para cocaína, norcocaína y cocaetileno y 17% para la benzoilecgonina, la baja capacidad que tiene el acetonitrilo de extraer las drogas del interior del pelo está relacionado a que produce menos hinchamiento de las fibras del pelo, pero tiene la ventaja que da extractos más limpios por lo que no se lo emplea solo sino en mezclas. Los mismos autores (Madry y col 2018) reportan un aumento significativo de la extracción de cocaína, norcocaína y cocaetileno y benzoilecgonina, del orden del 136% comparado con el metanol, cuando se emplea la mezcla: *metanol / acetonitrilo / tampón de formiato* pH 3.5 (1/1/2, v / v), atribuyéndolo al ácido fórmico del tampón que hincha la estructura de alfaqueratina del cabello mucho más que el agua o los alcoholes al romper los enlaces de hidrógeno. **No se halló correlación** entre la eficiencia de extracción y el pKa y Log P del analito.

La preparación de las muestras de pelo debe tener en cuenta, además, la estructura química de los compuestos a ser determinados y la posibilidad de alteración de los mismos por el uso de las sustancias empleadas en la extracción.

En nuestro caso varios de los alcaloides de interés son ésteres por lo tanto fácilmente hidrolizables en medio alcalino, la cocaína se hidroliza mayoritariamente a benzoilecgonina, lo que haría difícil evaluar la real concentración de la droga en el pelo si se emplean medios básicos de extracción. El empleo de un medio ácido es mandatorio si se pretende mantener la estructura de la cocaína (Kiszka, M y col, 2000). F l e t

cher, S. M y col (1981), reportaron que la degradación de la cocaína a pH 5 en orina, solución buffer de fosfato o solución acuosa ajustada a pH con HCl 0,1M, tiene muy buena estabilidad a una temperatura de 25C, hasta 30 días a pH 5 y al menos 7 días a pH6.

5.3.2.3.3 Breve descripción del método empleado de análisis de pelo.

Se usó el método validado por Broecker S. y col (2012), empleado para el análisis rutinario de pelo en el Instituto de Medicina Legal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Charité, basado en una publicación de Nielsen, M.K. y col (2010).

A los analitos monitoreados por el laboratorio (cocaína, norcocaína, benzoilecgonina, metilecgonina, cocaetileno, tropococaína), se agregó la medición de los compuestos de interés para nuestro trabajo: cinamoil-cocaína, higrina y cuscohigrina.

En la descontaminación del pelo se emplearon agua y acetona que como mencionamos previamente son los solventes más usados en esta etapa. Cuidando que los tiempos sean cortos (1 minutos) teniendo en cuenta que el agua produce la apertura de las fibras del pelo y la posible extracción de la droga ingerida.

La reducción del tamaño de partícula de una muestra inicial puede ser beneficiosa no solo para la homogeneización sino también para la preparación adicional de la muestra, como la disolución o la extracción.

El pelo, fue segmentado según el caso, y cada segmento fue cortado en pequeños segmentos de 1-2 mm, para lograr una muestra homogénea que facilite la preparación de la misma y su extracción. 20 mg del pelo cortado es colocado en un tubo Eppendorf (se agregan los deuterados) y extraído dos veces con 0,5 ml de una mezcla de metanol/acetonitrilo/2 mM amonio formiato (25:25:50, v/v/v) (pH ligeramente ácido ~5), durante 18 h a 37 C, ambos extractos se juntan, previamente centrifugados, son evaporados bajo nitrógeno hasta 0,5 ml quedando listo para su inyección en los equipos de LCMSMS y LC-QTOF-MS sin previo clean-up.

Nielsen, M.K. y col (2010) evaluaron las condiciones que arriba se

mencionan sobre 49 drogas entre ellas cocaína y benzoilecgonina. El empleo de un mayor porcentaje de agua en la mezcla de extracción dio lugar a más eficientes y reproducibles extracciones, al igual que la mezcla metanol: acetonitrilo resulta mejor que ambos solventes por separado. El aumento de la temperatura de 21° C a 37° C mejora tanto la eficiencia como el tiempo de extracción. Aumentó el 100% la extracción cuando se pasa de 2 a 18 h, pero también el aumento del tiempo de extracción a 37° C puede ser perjudicial para algunos analitos menos estables, por lo que los autores eligieron 18h de incubación.

5.3.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE FLUIDO ORAL.

5.3.3.1 Generalidades.

El fluido oral está constituido por las secreciones de glándulas salivares mayores y menores. Las glándulas salivares mayores contribuyen al fluido oral con los siguientes porcentajes: submandibular (65%), parotídea (20%) y sublingual (5%) y las glándulas menores contribuyen con el 10%, se consideran alrededor de 750 glándulas menores distribuidas en la lengua, paladar, mucosa oral y labial.

Las glándulas salivares mayores y menores aportan agua, proteínas, enzimas, electrolitos y pequeñas moléculas orgánicas. El fluido oral posee una microflora constituida por bacterias, virus y hongos orales, sangre y derivados de la sangre procedente del micro sangrado de la boca y células del revestimiento bucal. **Figura 5-4.**

El fluido oral tiene además componentes exógenos como restos de alimentos, pasta de diente, componentes de los enjuagues bucales etc. (Singh Mamta y col 2013; Rai B. 2006)

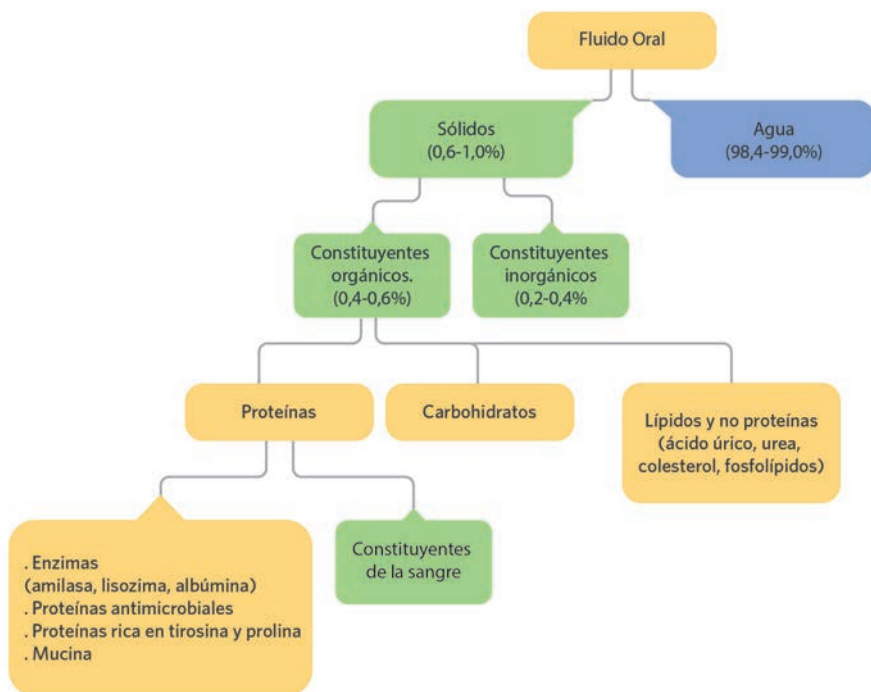


Figura 5-4: Composición bioquímica del fluido oral.

La mucina es una glicoproteína que le da la consistencia viscosa a la saliva.

El pH varía entre débilmente alcalino a débilmente ácido, rango entre 6,0-7,9, medio de pH de 6,6. La saliva es una secreción diluida con una gravedad específica de 1,007.

La composición salival depende de muchos factores como estimulación, dieta, edad, enfermedad, momento del día, etc.

La cantidad de saliva que se produce por día está entre 500 a 1500 mL/día (0,5 mL/min), cayendo a casi 0 durante el sueño.

Desde el punto de vista toxicológico el fluido oral refleja recientes exposiciones a las drogas entre 30 min a 24h, la eliminación dependerá del pH de la saliva y su producción. En el fluido oral es más prevalente la droga madre comparado a la orina donde los metabolitos están en

mayor proporción. Analíticamente tiene el inconveniente de ser una muestra de volumen limitado y baja concentración del analito.

5.3.3.2. Mecanismos de paso de las drogas del fluido oral a la sangre y la situación en los masticadores de hojas de coca por el empleo de sustancias alcalinas.

La difusión pasiva, el transporte activo y la ultrafiltración son los mecanismos por los cuales las drogas alcanzan la sangre desde el fluido oral. La difusión pasiva es el mecanismo más común para el transporte de drogas, en el cual las drogas se mueven siguiendo un gradiente de concentración sin gasto de energía. Para que esto ocurra los compuestos deben ser liposolubles y no cargados para poder pasar a través de la membrana de las células epiteliales de la cavidad bucal, la membrana basal y la membrana de los capilares. Los factores que influyen en ese pasaje son el pH del fluido oral y el del plasma, el pKa, el tamaño y la lipofiliidad de la droga (Choo R.E. y col 2004; Aps J.K.M y col 2005). El pH del plasma está muy controlado, siendo en sujetos sanos 7,4. Para un compuesto como la cocaína con un pKa de 8,6 (pH al cual la droga está 50% ionizada y 50% sin ionizar) la relación saliva/plasma estará entre 273 a 0,44 si el pH del fluido oral varía entre 5,0 a 7,8. (Kintz P. y col 2013), la cocaína quedará atrapada como sal en el fluido más ácido.

El uso de sustancias alcalinas durante el mascado de las hojas de coca eleva el pH del fluido oral a un valor cercano a 9, a ese pH los alcaloides de la hoja de coca: cocaína, cinamoilcocaína, tropococaina, metilecgonina, cuscohigrina e higrina se encontrarán prácticamente sin ionizar (sin carga) y la velocidad del paso desde el fluido oral a la sangre se verá favorecida por la mayor lipofiliidad o valor de Log Pow (**Tabla 5-3**). Así, por ejemplo, la cocaína y cinamoilcocaína cruzarán mejor las barreras de membranas hacia la sangre por su mayor afinidad con los lípidos, que la higrina y cuscohigrina.

5.3.3.3 Consideraciones del método de preparación de muestras por precipitación de proteínas.

La precipitación de proteínas es una de las técnicas de preparación

de muestras consideradas más rápidas y simples para remover las proteínas de las muestras biológicas. La remoción de proteínas puede llegar hasta un 98% siendo que es una de las fuentes principales de la disminución de la señal cuando se emplea LCMSMS, la precipitación de proteínas no es total y parte del analito de interés puede co-precipitar con las proteínas disminuyendo la recuperación del método.

Distintos agentes precipitantes pueden ser empleados:

- **Ácidos:** ácido fosfórico (5%); ácido tricloroacético (TCA) 10%.
- **Sales:** sulfato de amonio (saturado), cloruro de amonio al 5%.
- **Solventes:** acetonitrilo, metanol, etanol.
- **Iones metálicos.** Zinc.

Las proteínas se mantienen en solución por la interacción polar con el solvente acuoso, la interacción iónica con sales y fuerzas de repulsión electrostática entre moléculas cargadas. El pH al que una proteína, muestra un mínimo de solubilidad es su pH isoelectrico (pI), definido como aquel valor de pH al que la molécula no posee carga eléctrica y es incapaz de desplazarse en un campo eléctrico. En estas condiciones no existe repulsión electrostática entre moléculas de proteína vecinas y tienden a precipitar.

Los solventes orgánicos como metanol o acetonitrilo son los agentes precipitantes más empleados en la preparación de muestras por su bajo costo y mínimo desarrollo del método requerido. La adición de disolventes orgánicos neutros miscibles con el agua, particularmente metanol o acetonitrilo, disminuyen la solubilidad de la mayor parte de las proteínas globulares en medios acuosos, de tal manera que precipitan de su disolución. El estudio cuantitativo de este efecto muestra que la solubilidad de una proteína a un pH y fuerza iónica determinados está en función de la constante dieléctrica del medio. Puesto que el metanol o acetonitrilo poseen una constante dieléctrica menor que la del agua su adición a una disolución acuosa de proteína incrementa la fuerza de atracción entre las cargas opuestas, disminuyendo de este modo el grado de ionización de los grupos R de los aminoácidos (grupo amino y grupo carboxilo) de la proteína. Como resultado, las moléculas de proteína tienden a agregarse y precipitan.

Polson C. y col (2003), evaluaron a distintos agentes precipitantes, para determinar cuál era el más efectivo para remover las proteínas del plasma humano y encontraron que el acetonitrilo remueve el 93,2% de las proteínas, el ácido tricloroacético el 91,3% y sulfato de zinc el 98,8% a una relación agente precipitante: plasma 2:1.

La relación agente precipitante: plasma es otro punto importante al momento de emplear el método de preparación de muestras por precipitación de proteínas y también fue evaluado por Polson C. y col (2003) y se muestra en la **Tabla 5-4** (plasma humano).

Relación agente precipitante: plasma							
	0,5:1	1:1	1,5:1	2:1	2,5:1	3:1	4:1
ACN	3,6	88,7	91,6	92,1	93,2	93,5	94,9

%Eficiencia PP= (Proteína total plasma-proteína del sobrenadante) /Proteína total *100

Tabla 5-4: Porcentaje de eficiencia de precipitación de proteínas.

En general con una relación 2:1 ya se obtiene una 92% o más de proteína precipitada.

Las bajas temperaturas disminuyen la solubilidad de las proteínas por lo que el acetonitrilo es aconsejable usarlo como agente precipitante en frío.

5.3.3.4 Método de preparación del fluido oral empleado en nuestros análisis.

Las muestras de fluido oral analizadas en nuestro trabajo (*mascador de hoja de coca, bebedor de té de coca y consumidores de cocaína*) se procesaron previo a su inyección en LCMSMS por precipitación por proteínas. Si bien la precipitación por proteínas es una preparación de muestras recomendada en el caso de suero/plasma humano que tiene una concentración de proteínas alta entre 6 a 8% con respecto al fluido oral, que es una matriz fundamentalmente acuosa 98% a 99% y tiene un bajo porcentaje de proteínas menor de 0,6% (**Figura 5-4**), resulta de utilidad principalmente por la eliminación de la mucina que le da una consistencia viscosa que hace muchas veces difícil el pipeteo de la muestra.

En razón de que no se hallaron referencias bibliográficas de análisis de higrina y cuscohigrina en el fluido oral se decidió tomar la muestra de fluido oral por salivación en un tubo y no emplear los recolectores comerciales del tipo del Salivette® o Quantisal® (agregábamos un variable extra a nuestros ensayos) así obteníamos un fluido oral puro pero viscoso más difícil de trabajar como lo mencionamos previamente; por otro lado la preparación de las muestras por una simple precipitación de proteínas nos podría asegurar la conservación de nuestros dos marcadores higrina y cuscohigrina en el sobrenadante de acetonitrilo. En la preparación de muestras empleando la extracción con solvente/s o en con fase estacionario (SPE) participan principios de extracción más complejos sobre los cuales no teníamos información científica.

Si bien la precipitación por proteínas es una técnica de extracción efectiva, resulta a menudo, cuando las muestras son luego analizadas en un LCMSMS, tener un efecto matriz significativo por componentes residuales de la matriz. El efecto matriz de nuestras técnicas de preparación de muestras será discutido cuando se aborde el tema instrumental, **sección 5.4.4.**

Se empleo en nuestras muestras de fluido oral una precipitación de proteínas con acetonitrilo frío en una **relación solvente: muestra 3:1.** Según la Tabla 5-4 estaríamos en una eficiente relación acetonitrilo: fluido oral para precipitar las proteínas.

5.3.4 PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE PLASMA.

5.3.4.1 Generalidades

El plasma es el componente líquido de color amarillento de la sangre. Es una solución de sales y proteínas y actúa como una suspensión para glóbulos rojos y blancos y plaquetas.

El plasma constituye aproximadamente el 55% del volumen de sangre y se compone de: 90% de agua, 6% - 8% de proteína, 0.9% de sales inorgánicas (sodio, potasio, calcio, carbonato, fosfato), 1.1% de sustancias orgánicas. El plasma contiene tres tipos principales de proteínas: albúminas, globulinas y fibrinógenos.

La sangre entera o plasma o suero son las muestras de elección para

cuantificar e interpretar la concentración de las drogas y sus metabolitos.

5.3.4.2 Consideraciones sobre el método de preparación de muestras por fase estacionaria sólida. (SPE)

La preparación de muestras por SPE da lugar a la extracción de analitos de diversas características fisicoquímicas y matrices, produciendo extractos limpios y concentrados, además, es una técnica que puede ser automatizada.

En la SPE el/los analitos/s se someten a un proceso de partición entre una fase sólida estacionaria y la fase líquida de la matriz en la que están disueltos. Deben tener mayor afinidad por la fase estacionaria de la que finalmente después de los lavados y eliminación de la matriz serán eluidos.

En SPE la fase sólida es muy variada y en la elección adecuada de esta fase estará el éxito de la extracción, dependiendo del tipo de analito y su/s grupo/s funcional/es que son los que interaccionarán con la fase estacionaria.

La SPE es una técnica empleada como alternativa a la extracción líquido-líquido, en especial en matrices con alta cantidad de proteínas como la sangre/suero/plasma que pueden producir emulsiones con el uso de solventes.

La SPE puede tener varias etapas que deberán ser optimizadas en cada técnica, por otro lado, algunas impurezas de la matriz podrán coeluir con el analito y ser luego al ser analizado por un LCMSMS causa de efecto matriz.

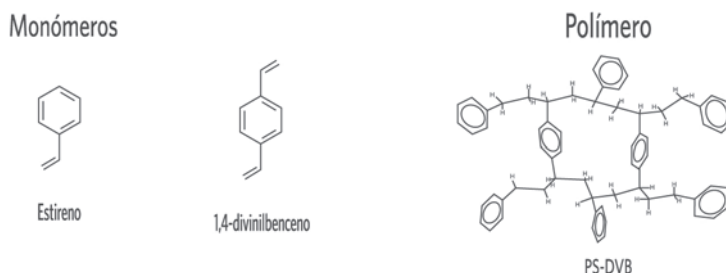
Las fases estacionarias son variadas:

- Las bases de sílice modificadas de fase inversa con cadenas alquílicas (C18, C8, Ph, CH), fase normal con grupos CN o NH₂ y la fase intercambiadora de iones (intercambiadores catiónicos y aniónicos). Estas fases tenían la desventaja de pobre recuperación de analitos polares, inestabilidad a pHs extremos y restos de silanol en el extracto.

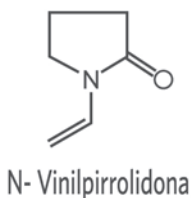
- Las de base carbón: carbón negro grafitizado (GCB) y carbón negro poroso (PGC), la desventaja que los analitos quedan fuertemente adsorbidos y son difíciles de eluir.

- El tercer grupo de fases estacionarias que apareció es la polimérica

(no presenta las desventajas de las anteriores), la primera fue un poli(es-tireno-divinilbenceno) PS-DVB macroporoso, el DVB funciona como agente entrecruzante entre las cadenas de poliestireno, estas fases son de estructura hidrofóbica, sus interacciones con el analito son a través de fuerzas hidrófobas e interacciones π - π con el anillo aromático de la estructura polimérica, el área superficial específica de estos polímeros es de hasta 800 m² g⁻¹.



Para mejorar los procesos de extracción en SPE las fases estacionarias deben tener una mayor capacidad de retención aumentando el área superficial, así aparecieron las fases hypercrosslinked, pero estos siguen siendo de carácter hidrofóbico por lo que para mejorar los resultados con compuestos polares se le debe introducir polaridad al polímero para aumentar las interacciones con los analitos polares. Una manera de hacer el polímero más hidrofílico es agregar grupos polares como la N-Vinilpirrolidona entre otros.



5.3.4.3 Preparación de las muestras de plasma con la extracción en fase estacionaria (SPE) Strata™-X 33 μ m Polymeric Sorbent.

Las muestras de plasma fueron analizadas para la cuantificación de cocaína, benzoilecgonina y cuscohigrina, posteriormente al mascado de hojas de coca empleando un método validado en el laboratorio para

cocaína y benzoilecgonina.

Se empleó para la preparación de las muestras de plasma los cartuchos de la marca comercial Phenomenex Strata™-X 33 μm Polymeric Sorbent.

Químicamente es una fase de poli (estireno divinilbenceno) (PS-DVB) que es hidrofóbica a la cual se le agregó el grupo hidrofílico N-vinilpirrolidona. Esto permite interacciones π - π , hidrofóbicas y dipolo-dipolo según se muestra en la **Figura 5-5**:

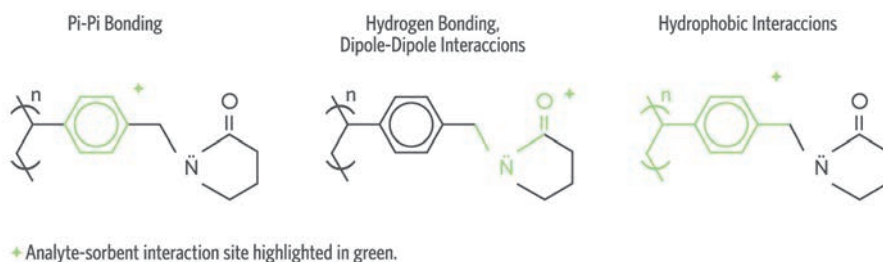


Figura 5-5: Tipos de interacciones analito-fase estacionaria.

Los datos aportados por la empresa comercial de las columnas/ cartuchos Strata™-X 33 μm Polymeric Sorbent son: tamaño de partícula: 33 μm ; tamaño de poro 88 Å, área superficial 800 m^2/g , estabilidad pH entre 1 a 14.

Los pasos en la extracción son los siguientes: **Figura 5-6**

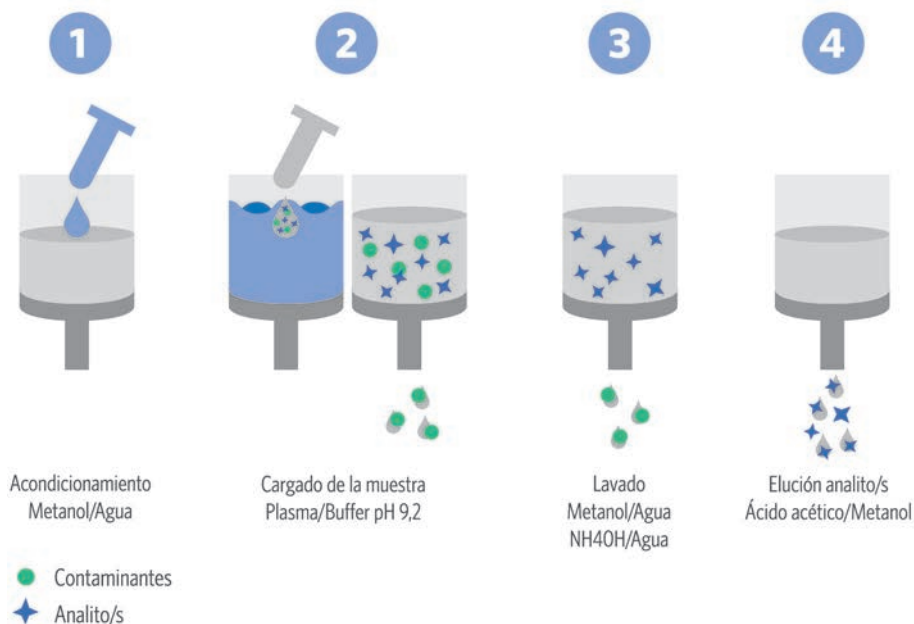


Figura 5-6: Pasos en la extracción en columnas SPE.

1. En el primer paso se remueve el aire atrapado en la fase y se solvata y activan los ligandos sobre la superficie de las partículas de la fase estacionaria, esto permite que la fase estacionaria interactúe más eficientemente con las drogas.

2. El plasma llevado a pH 9,2 con tampón borato se carga lentamente sobre la fase estacionaria para que interactúe el analito con ésta. A este pH 9,2 que es mayor o cercano al pK_a de la cocaína, benzoilecgonina y cuscohigrina, **Tabla 5-3** los tres analitos estarán mayoritariamente no ionizados, siendo según su liposolubilidad cocaína > cuscohigrina > benzoilecgonina y es esperable interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas con la fase estacionaria de la columna.

3. En la etapa 3, la del lavado alcalino, se eliminarán los contaminantes que no quedaron unidos a la fase estacionaria, los analitos continuarán unidos a la fase estacionaria sin ser alterados.

4. En la última etapa, empelando un eluyente ácido los analitos de carácter básico unidos a la fase estacionaria serán liberados y eluidos.

El extracto será evaporado y analizado por alguna técnica instrumental.

Una de las características de estas columnas es su amplio rango de pH de trabajo de 1 a 14, lo que permite en el lavado emplear una solución alcalina (pH~11) y una solución ácida (pH~3).

Los cartuchos Strata™-X 33 µm son usados para determinar la concentración en plasma de cocaína y benzoilecgonina a través de una técnica validada en el laboratorio como se mencionó anteriormente. Por las características de la SPE y las propiedades químicas de la cuscohigrina antes expuestas era esperable que pudiera ser retenida y luego eluida junto con la cocaína y benzoilecgonina.

Se realizaron spike de muestras de plasma con concentraciones de cuscohigrina entre 10ng/mL hasta 400 ng/mL obteniéndose una respuesta lineal con un R^2 de 0,9987 entre 20 a 400 ng/mL y un límite de detección de 10 ng/mL y una recuperación mayor de 70%. **(Gráfico 5-1)**

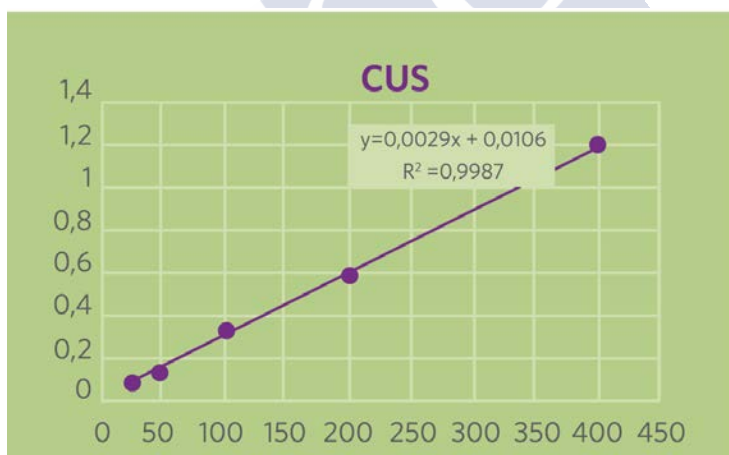


Gráfico 5-1: Curva de calibración de la cuscohigrina.
Relación área-cus/área-coc-d3 vs concentración (ng/mL)

Los resultados de las concentraciones en plasma de un masticador de hoja de coca serán discutidos en el *Capítulo 6 - Sección 6.3*.

5.3.5 Preparación de muestras biológicas de origen vegetal y no biológicas.

5.3.5.1 Hojas de coca.

Como ya detalláramos en el capítulo de la planta de coca, dos son las *Erythroxylum* empleadas para mascar, la *E. coca* y la *E. novogranatense* con sus dos variedades, *E. coca* var. *coca* y *E. coca* var. *lapdú*; por otro lado, la *E. nov.* var. *novogranatense* y la *E. nov.* var. *Truxillense*.

Las hojas de coca se adquieren fácilmente en el norte argentino sea en las ferias de productos alimenticios o en kioscos. Son vendidas en bolsitas (de aproximadamente 25 o 50 gramos) o bien se mantienen en la heladera empaquetadas como panes y se compra la cantidad que se desea. Por supuesto no se indica qué especie de *Erythroxylum* se vende, en general los locales las suelen definir como hojas de coca “grande” y hojas de coca “pequeñas”. Así se las describió en al momento de la entrevista a los donantes de orina y pelo del noroeste argentino (provincia de Salta). La hoja de coca no es un producto que este controlado por los organismos de fiscalización de Argentina por lo tanto no respeta parámetros de producción. En la **Foto 5-1** se muestra un envase comercial y hojas adquiridas en comercios del norte de Argentina.



Foto 5-1: Hojas de coca adquiridas comercialmente en el norte argentino (derecha) y bolsa plástica (izquierda) de una marca que las comercializa.

Se envió a analizar a la cátedra de botánica de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires una de las bolsitas adquiridas a vendedores de la calle. Se empleó para su análisis la técnica

de diafanizado según Carzola M (1972); Rury P. y col. (1981); Rury P. y col. (1983); Belmonte E. y col. (2001), las hojas fueron clasificadas como pertenecientes a *E. novogranatense* var. *Truxillense* (de Perú). (Foto 5-2).

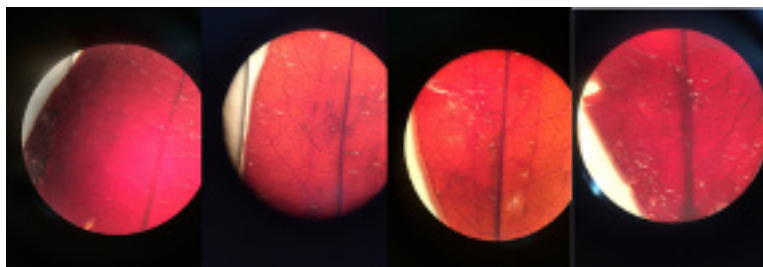


Foto 5-2: Fotografías de diafanizados de hojas de coca.

Esto no indica que todas las hojas que se venden en Argentina sean *E. novogranatense* var. *Truxillense* (de Perú), el ingreso de las hojas de coca desde Perú o Bolivia no es en general mayormente controlado.

Las hojas de coca analizadas y empleadas por los voluntarios en los diferentes trabajos pertenecen a hojas compradas en forma aleatoria y en diferentes momentos en el norte argentino. Se desconoce el lugar de compra de las hojas de coca del grupo de mascaradores de hoja de coca frecuentes del norte argentino, los cuales llevaban varios años con esta práctica y que entregaron para su análisis una muestra de orina y pelo; este grupo describió, en la entrevista que se les realizó, a las hojas que consumían como “hojas grandes” u “hojas pequeñas”.

Las hojas de coca fueron extraídas bien para ser empleadas con fines de comparación con las muestras analizadas, especialmente para emplear al alcaloide higrina como testigo (sea para conocer su tiempo de retención o espectros de masa) en razón de que no fue posible durante todo el tiempo que duraron los estudios de esta tesis obtener un testigo indubitante. Además, las hojas de coca fueron extraídas para conocer la composición porcentual de sus alcaloides.

Según UNODC-2012 los alcaloides como cocaína, cinamoilcocaína metilecgonina o el metabolito de la cocaína son solubles en alcohol y en caliente la extracción es mayor.

Se realizaron extracciones con metanol con agitación durante 24 h a 40 °C o bien empleando metanol: acetonitrilo: 2mM formiato de amonio (pH ~5,3) (25:25:50) (fase móvil empleando en el LCMSMS) con agitación, todos los extractos fueron luego diluidos 1/50 o 1/100 antes de ser inyectados en CGMS o LCMSMS.

5.3.5.2 Té de coca.

El té de coca empleado en nuestros ensayos por los voluntarios se adquirió en forma comercial, corresponde a distintas marcas y tipos como se observa en la **Foto 5-3**.



Foto 5-3: Té de coca.

Para analizar los saquitos de té (1g) se procedió a preparar un té con 200ml de agua a 95 °C por 5 minutos, luego se hizo una dilución 1/50 con formiato de amonio 10mM: acetonitrilo y se inyectó en un LC-MSMS.

5.3.5.3 Muestras de secuestro.

Las muestras de secuestro de cocaína analizadas pertenecen a muestras incautadas por las autoridades policiales de: España, Italia y Argentina. Se procedió a pesar una cantidad determinada y hacer diluciones en metanol para su posterior inyección en un CGMS.

5.3.5.4 Muestras de las distintas etapas de la producción clandestina de cocaína.

A partir de hojas de coca se procedió a obtener pasta base de coca y coca base en el laboratorio empleando los dos métodos propuestos el de extracción por solvente y el de extracción ácida (Casals J.F. y col.

1993). En cada una de las distintas etapas se procedió a analizar la presencia de higrina y cuscohigrina para establecer en qué momento del proceso de producción de cocaína ilícita se perdían estos alcaloides. En el *Capítulo 6 trabajos presentados-poster* (sección 6.3. GRUPO A) se detallarán las distintas etapas y los puntos de análisis.

La introducción a la explicación fisicoquímica de la pérdida de higrina y cuscohigrina en la etapa temprana de la producción ilegal de cocaína fue dada en el punto: **“5.3.1 Preparación de muestras de orina”**.

El mayor carácter hidrofílico de la higrina y cuscohigrina con respecto a la cocaína, son muy solubles, solubles o ligeramente solubles en agua aún a pH alcalino (**Tabla 5-3**), hacen que la higrina y cuscohigrina se pierdan en el proceso de producción ilegal de la cocaína a partir de las hojas de coca en las primeras fases de la extracción cuando se emplea kerosene o naftas en medio alcalino en la extracción de los alcaloides de la hoja de coca. Los hidrocarburos derivados del petróleo (kerosene o naftas) son compuestos no polares, y como se muestra en la **Tabla 5-5**, están entre las sustancias menos polares lo que explicaría su pobre afinidad por la higrina y cuscohigrina y su poder de extracción sobre la cocaína y cinamoilcocaína que tienen valores de Log Pow mayores.

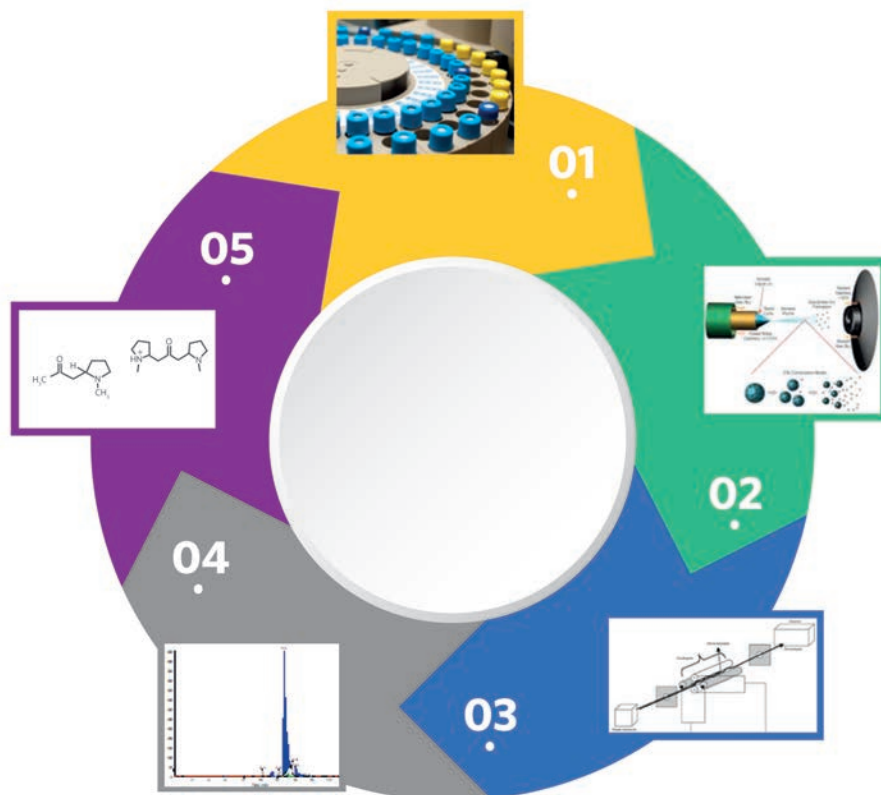
La similitud en Log Pow de la cocaína y cinamoilcocaína y su afinidad por solventes no polares hacen que la cinamoilcocaína acompañe en la extracción a la cocaína y sea necesario eliminarla por métodos oxidantes como el uso del permanganato de potasio o **lavado con etanol** (Boudreau D. y col 2008).

Relative Polarity	Formula	Group	Solvents
<div>Non-polar</div> <div>↓</div> <div>Polar</div>	R-H	Alkanes	Petroleum ethers, hexanes, ligroin
	ArH	Aromatics	Toluene
	R-O-R	Ethers	Diethyl ether
	R-X	Alkyl halides	Ticholoromethane, chloroform
	R-COOR	Esters	Ethyl acetate
	R-CO-R	Aldehydes and ketones	Acetone, MEK
	R-NH ₂	Amines	Pyridine, thiethylamine
	R-OH	Alcohols	MeOH, EtOH, IPA, Butanol
	R-COHN ₂	Amides	Dimethyformamide
	R-COOH	Carboxylic Acid	Ethanoic Acid
	H-O-H	Water	

Tabla 5-5: Polaridad de solventes.




SECCIÓN 2

TECNICAS INSTRUMENTALES



5.4 TÉCNICAS INSTRUMENTALES.

5.4.1 Técnicas instrumentales empleadas-Generalidades.

Como se expuso al inicio de este capítulo el describir detalladamente cada uno de los instrumentos usados en nuestros trabajos de investigación no forma parte de los objetivos de esta tesis, solo nos detendremos a desarrollar aquellos temas instrumentales que consideramos son necesarios explicar porque hacen al hallazgo de nuestros resultados. En la Tabla 5-6 se resumen las técnicas instrumentales empleadas. Se marcan con    los puntos que se desarrollarán.

Explicando brevemente la **Tabla 5-6** en las que se describen las técnicas instrumentales empleadas en esta tesis:

- Básicamente las técnicas consisten en una separación a través de la cromatografía (gaseosa o líquida) y en interfase una técnica de identificación y cuantificación como la espectrometría de masa.

- En la cromatografía es de importancia el tipo de columna seleccionado para arribar a una separación de los compuestos de interés, que como vimos previamente son polares y no polares (dependiendo del pH). Siendo la columna fundamental en un análisis cromatográfico se detallará el funcionamiento y se explicarán, nuestros resultados, en función de las características de las dos columnas empleadas en CGMS (*HP 5% phenylmethylsilicone capillary column, (30 m x 0.25 mm. i.d., 0.25 mm film thickness, Agilent)*) y en LCMSMS (*Poroshell 120 HILIC, 2.1 x 100 mm, 2.7 µm, (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)*).

- La muestra debe ser introducida en el espectrofotómetro de masa ionizada, generándose el ión a partir de una molécula neutra, este paso de ionización ocurre en la fuente de iones.

Los iones se pueden producir mediante la eliminación de uno o más electrones de una molécula usando ionización electrónica o impacto electrónico (**EI**) a vacío, en donde las moléculas de las muestras son ionizadas por un haz de electrones de elevada energía. Este método de ionización es históricamente el dominante y es el método de ionización utilizado en la espectrofotometría de masa, más comúnmente en cromatografía de gases con espectrometría de masas.

ABREVIATURA	TIPO DE CROMATOGRAFIA	COLUMNA	TIPO DE IONIZACIÓN	ANALIZADOR DE MASAS	MODO ADQUISICIÓN	MUESTRA ANALIZADA	CRITERIOS DE IDENTIFICACIÓN
CGMS	Gaseosa	HP 5% phenylmethylsilyl/silicone capillary column (30 m x 0.25 mm. i.d., 0.25 mm film thickness, Agilent)	Impacto electrónico (EI)	◆ Cuadrupolo simple	Full SCAN	Orina	minimo 4 iones (1 punto x ion)* Índice de retención Kovats ◆
CGMSMS	Gaseosa	HP 5% phenylmethylsilyl/silicone capillary column (30 m x 0.25 mm. i.d., 0.25 mm film thickness, Agilent)	Impacto electrónico (EI)	Cuadrupolo simple Triple cuadrupolo (QQQ)	Full SCAN MRM	Manufactura cocaína	minimo 2 transiciones* (2 puntos x transición)
LCMSMS	Líquida	HILIC ◆ Poroshell 120 HILIC, 2.1x100 mm, 2.7 µm, (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)	Electrospray, Modo positivo	Triple cuadrupolo, (QQQ)	MS-SIM	Pelo, cocaína manufacturada, té de coca, hojas de coca.	minimo 2 transiciones, (2 puntos x transición) *
LCMSMS	Líquida	LabPoroshell 120 Hilic (2.7 µm, 2.10 x 100mm2) from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA)	Electrospray, Modo positivo	Hybrid Triple Quadrupole/Linear Ion Trap.	MS-SIM	Fluido oral, orina, hojas de coca.	minimo 2 transiciones, (2 puntos x transición) *
LC-QTOF-MS	Líquida	Poroshell 120 HILIC, 2.1x100 mm, 2.7 µm, (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)	Electrospray, Modo positivo	Tiempo de vuelo (TOF) sin CID: MS/MS ◆ con CID	MS-SIM	Pelo	Masa exacta **

Full SCAN: masas monitoreadas de 50 a 450
MRM: multiple reaction monitoring (d—dynamic)

CID: Collision Induced Dissociation

* OSACA: Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science. Requerimiento para identificación de un compuesto 4 puntos
(**) Se empleó la masa exacta para la identificación de la higrina y los metabolitos de la cuscohirgina.

In order to achieve minimum identification criteria, a chromatographic or electrophoretic separation technique and a minimum of four (4) points shall be required.



Tabla 5-6: técnicas instrumentales empleadas en los ensayos de esta tesis.

La eliminación de un electrón produce un ión cargado positivamente.



Cuando se emplean fuentes de ionización en modo positivo como en el electrospray (a presión atmosférica), comúnmente empleado en la cromatografía líquida con espectrometría de masas, la formación de un ion positivo resulta de la adición de uno o más protones al sitio básico de la molécula. Esto es una protonación dando lugar a una carga positiva. La masa del ion será mayor que la molécula original sin carga por la adición de un protón (1Da). (Rockwood, A.L. 2018)

Los iones formados en la fuente de iones se separan de acuerdo con valores m/z en un analizador de masas. El término analizador de masas es de uso común, aunque más correctamente se llamaría un analizador m/z dado el hecho de que en los espectrómetros de masas se separan iones según su relación masa/carga (m/z), y no su masa. Donde m es el peso molecular del ion (en daltons) y z es el número de cargas positivas presentes en la molécula. Para moléculas <1000 daltons la carga generalmente es 1 y el valor m/z es la masa del ion molecular.



Figura 5-7: Fuentes de ionización y su aplicación según peso molecular y polaridad.

En la **Figura 5-7** se muestran las fuentes de ionización según el peso molecular y la polaridad de las moléculas, nuestros ensayos emplearon impacto electrónico (CGMS) y electrospray (ESI) en LCMSMS, que abarcan las características requeridas: pesos moleculares menores a 1000 daltons para CGMS y una polaridad dependiente del pH por lo que ambos sistemas resultaron aptos para nuestros estudios.

El analito ionizado entra en un analizador de masas, que es la parte del instrumento en el que los iones se separan en función de sus valores m/z . El analito ionizado puede sufrir fragmentación, por la aplicación de energía que provoca la ruptura de los enlaces internos y la producción de múltiples especies químicas independientes.

En impacto electrónico la energía aplicada mayoritariamente es de 70 eV, los datos del analizador pueden ser adquiridos en modo SCAN cuando se hace un screening de los posible compuestos de una muestra en un rango de masas. A los fines de identificar un compuesto se requieren 4 iones del espectro del analito en estudio comparado con un testigo, con una variación **no mayor a un 20%** o bien la comparación con una librería de espectros solo a los fines de screening. Otro modo de adquisición de datos es el SIM (selected ion monitoring) cuando se monitorean solo algunos fragmentos del o los analitos, esto reduce el ruido y aumento de esta manera la sensibilidad.

En el caso de los analizadores masas *tándem* la energía de fragmentación es manejada por el operario, y la fragmentación se produce en la celda de colisión (CID: Collision Induced Dissociation), en los triple cuadrupolos uno de los modos de adquisición es el MRM (multiple reaction monitoring), en el primer cuadrupolo se selecciona el/los iones precursores cargados positivamente (la molécula del analito), el segundo cuadrupolo es la celda de colisión en donde se produce la fragmentación del analito a través de un gas como el nitrógeno y el tercer cuadrupolo detecta los fragmentos de interés (iones productos) según su relación m/z , al menos dos transiciones por analito deben ser monitoreadas para reunir los criterios de identificación vigentes por ejemplo por la Organization of Scientific Area Committees for Forensic Science (OSACA), que requiere reunir 4 puntos para la identificación de un

compuesto, cada transición en este caso equivale a 2 puntos. En algunos equipos de triple cuadrupolo es posible emplear el modo Dynamic Multiple Reaction Monitoring (dMRM) en el cual el analizador de masa solo verá las transiciones o iones producto empleando ventanas de tiempo de retención, y solo se ocupará de monitorear cada transición en la ventana de tiempos que le corresponda. **Figura 5-8** muestra el proceso en MRM.

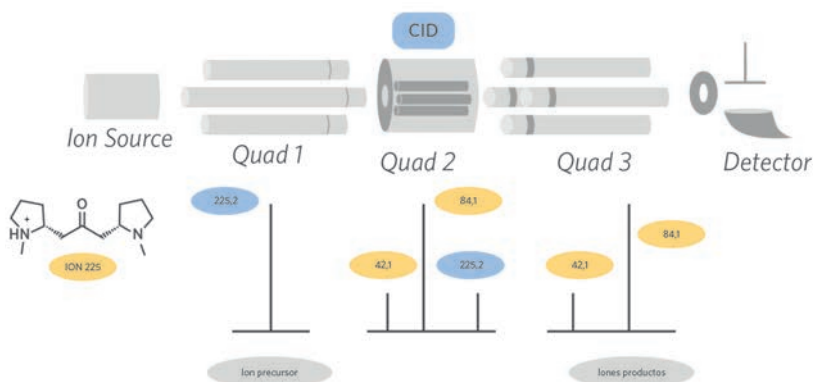


Figura 5-8: Esquema fuente de iones triple cuadrupolo, Q1, Q2 (CID) y Q3, tipo de scan MRM (6460 QQQ Agilent)

Dentro de los ampliamente utilizados analizadores de masa tenemos: los cuadrupolos (Q), el ion trap (QIT) y los tiempos de vuelo (ToF) y los analizadores de masa híbridos como el cuadrupolo tiempo de vuelo-masa (QToF-Ms) que será detallado más adelante (**Figura 5-15**), o el analizador híbrido triple cuadrupolo/Ion Trap lineal (**Figura 5-9**), empleado en las determinaciones de fluido oral y estabilidad de la cocaína, higrina y cuscohigrina y otros alcaloides y metabolitos en orina; la diferencia con el triple cuadrupolo mostrado en la **Figura 5-8** (empleado en nuestros análisis de pelo) es que tiene una celda inicial Q0 trapping que atrapa los iones, mientras el Q3 sigue haciendo el análisis de los iones m/z que van pasando.

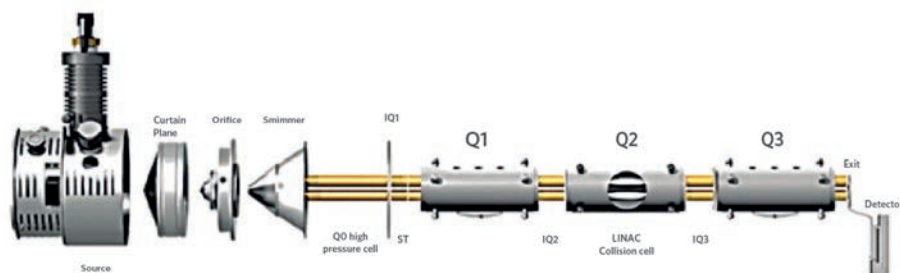


Figura 5-9: Esquema de un analizador híbrido Triple cuadrupolo / Ion Trap lineal.
AB (SCIEX 3200 QTRAP®)

5.4.2 Pasos desde el hallazgo, pasando por la identificación tentativa hasta la confirmación de los dos marcadores de mascado de hojas de coca: higrina y cuscohigrina.

5.4.2.1 Cromatografía gaseosa con detector de masa (CGMS)

La cromatografía de gases es una técnica de separación para solutos que sean volatilizables y estables térmicamente entre 400 °C a 450 °C o menores. Aproximadamente un 10% a 20% de los compuestos son separable por cromatografía gaseosa.

La técnica de cromatografía gaseosa con detector de masa fue la primera que empleamos sobre muestras de orina cuando no teníamos ninguna orientación del o los compuestos a buscar. Decidimos empezar por una técnica que era empleada de rutina en el laboratorio para buscar drogas en orina y tratar de hallar en el cromatograma algún pico o picos que pudieran ser un indicio de algún compuesto proveniente de la hoja de coca en las orinas de los masticadores.

Las cromatogramas de orina de los masticadores de hoja de coca mostraban los alcaloides identificables en toda muestra de consumidores de cocaína: cocaína, metilecgonina y cinamoilcocaína, pero en todas se repetían dos picos uno de ellos de importante abundancia que salía entre la metilecgonina y la cocaína (pico “a”) y otro más pequeño que salía a los pocos minutos del solvente de corrida (pico “b”) (**Figura 5-10**), que no eran observable en los consumidores de cocaína. La benzoilecgonina, como ya explicamos en la sección anterior de preparación de muestras,

no es extraíble con el solvente metilterbutil éter (MTBE) empleado en las extracciones.

Etapas en la identificación de los compuestos “a” y “b” .

Dos fueron las etapas para hallar la estructura de los compuestos “a” y “b”

Identificación tentativa que incluye:

- ❖ La comparación con librerías comerciales,
- ❖ El análisis de los espectros de masa e información científica.
- ❖ Determinación del tiempo de retención aproximado a partir del índice de retención de Kovats.
- ❖ La comparación con espectros obtenidos de extractos de hoja de coca.

Confirmación estructural de los compuestos “a” y “b” a través de:

- ❖ Testigos indubitables.
- ❖ Masa exacta empleando LC-QTOF-MS.

5.4.2.2 Identificación tentativa de los compuestos “a” y “b”.

5.4.2.2.1 Bibliotecas comerciales.

Comparación
con librerías
comerciales

No fueron identificados ninguno de los dos picos por la librería comercial NIST ni por la Pleger-Maurer-Mayer. Estos picos no se observaban en las muestras de orina de los consumidores de cocaína.

En la **Figura 5-10** se muestra un cromatograma de un mascarador de hojas de coca, en general los extractos que se obtienen con la extracción líquido-líquido a pH alcalino empleando metilterbutil éter como solvente de extracción son relativamente limpios. Se identifican como “a” y “b” los picos de referencia.

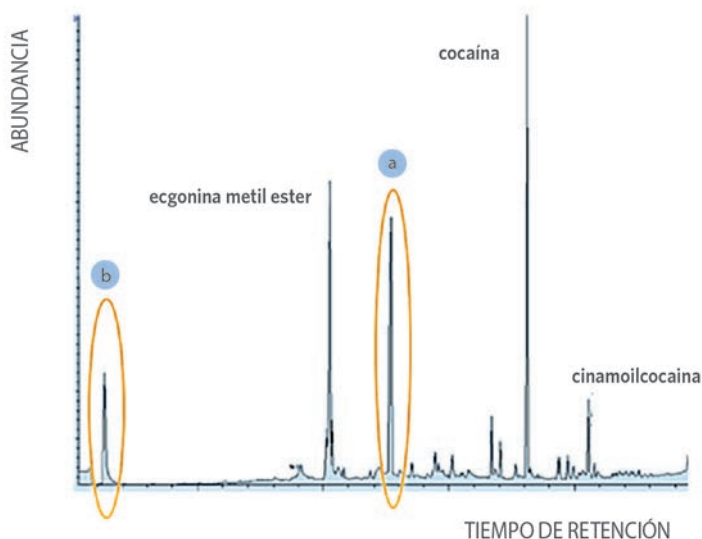



Figura 5-10: Cromatograma de la orina de un mascador de hojas de coca.

Se usó una columna capilar HP-5ms 5% phenylmethylsilicone (30 m _ 0.25 mm. i.d., 0.25 mm film thickness, Agilent), tiene un sangrado de columna mínimo y una actividad de columna que permite analizar una amplia variedad de analitos. Es en general una de las columnas de mayor uso en los laboratorios de toxicología forense.

En el caso de las fases estacionarias líquidas como la de polisiloxanos tres tipos de interacciones se producen: dispersión, dipolo, enlace de hidrógeno, que son mostradas en la **Tabla 5-7**. La dispersión es la interacción dominante para todas las fases estacionarias de polisiloxano. La dispersión se puede entender como el concepto de volatilidad. Es decir, cuanto más volátil es un soluto, más rápidamente se eluye en la columna (por ejemplo, tiempo de retención menor). (Agilent 2010)



Grupo funcional	Dispersión	Dipolo	Enlaces de hidrógeno
Metilo	Fuerte	Ninguno	Ninguno
Fenilo	Fuerte	Ninguno o débil	Débil
Cianopropil	Fuerte	Muy fuerte	Moderada
Trifluoropropil	Fuerte	Moderada	Débil
PEG	Fuerte	Fuerte	Moderada

Tabla 5-7: Interacciones de fase estacionaria.

La columna capilar HP-5ms es una columna de dimetil polisiloxanos 95% con 5% de grupos funcionales fenilo, es una columna no polar pero menos comparativamente que las columnas de metilpolisiloxanos, de muy bajo sangrado de columna y su principal mecanismo de interacción es la dispersión. Los compuestos más polares eluirán antes que los menos polares como regla general.

Por lo tanto, los dos picos desconocidos (“a” y “b”) que se observaban en el cromatograma tendrían una polaridad similar al metabolito de la cocaína, la ecgonina metil éster que además es un alcaloide de la hoja de coca y serían **más polares que la cocaína y la cinamoilcocaína**.

5.4.2.2.2 Cromatografía gaseosa con detector masa.

Análisis de los espectros de masa e información científica

Como vemos en la **Tabla 5-6** en la técnica de CGMS se empleó una fuente de ionización al vacío por impacto electrónico a 70 eV y los iones según su relación m/z son separados y analizados en un cuadrupolo.

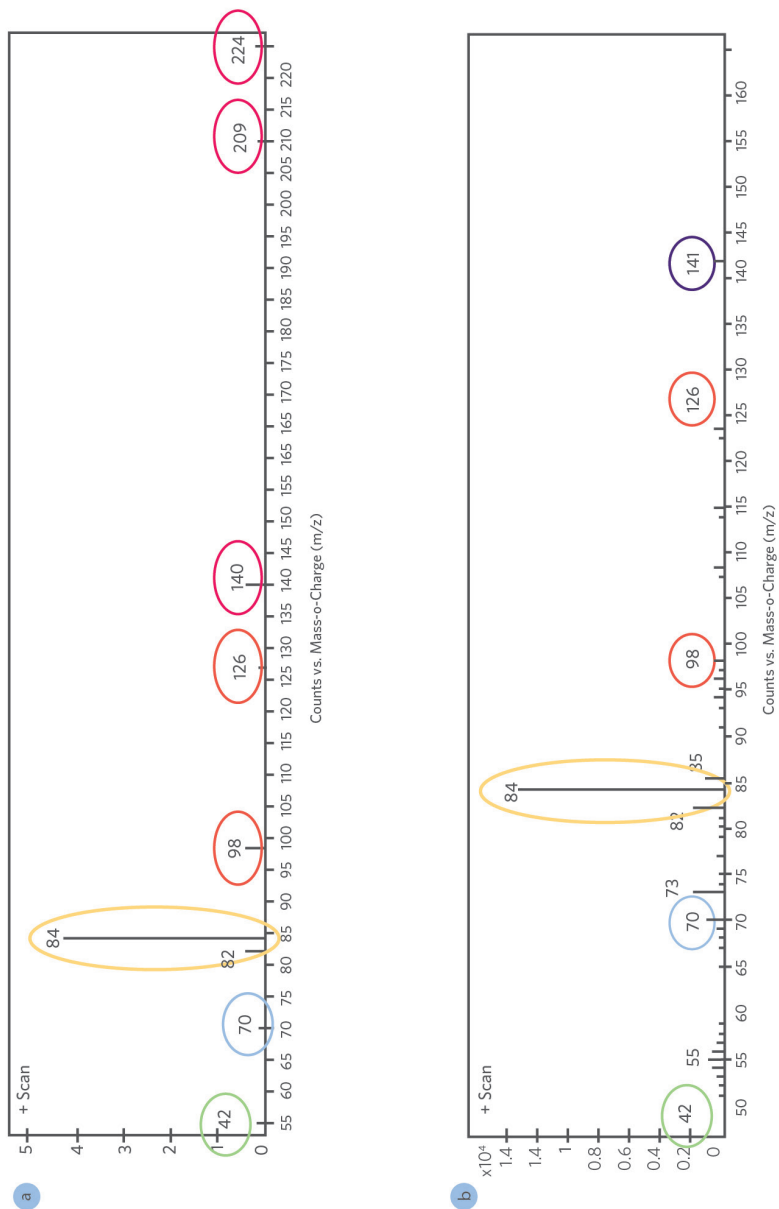


Figura 5-11: Espectros de masa de los compuestos “a” y “b”.
Rango entre 50-450 daltons.

Característica de los espectros de masa que surgen de una primera observación:

- Tienen un espectro de masa con un pico base (mayor intensidad) correspondiente al ion m/z : 84 (100%) y el resto de los fragmentos de poca abundancia o intensidad. Hace suponer que el ion 84 por su intensidad es un fragmento de la molécula muy estable.

- Comparten los dos compuestos “a” y “b” iones en común por lo que podría pensarse en una parte molecular similar: iones m/z : 70; 84; 98; 126 y relaciones isotópicas similares. El ion m/z 42 se coloca en la imagen porque como veremos más adelante es uno de los fragmentos de mayor abundancia, pero no fue detectado porque el rango de masa analizado fue entre 50 a 450 daltons, se explicará posteriormente.

- El ion molecular (M^+ sin un electrón), o sea el peso molecular del compuesto, podría considerarse para el compuesto $a=224$ y para el compuesto $b=141$. Según la regla en espectrometría de masa el ion molecular es de masa par, a no ser que tenga un número de nitrógenos impar, el número de nitrógenos par da lugar a masas par. De lo que se deduce que el compuesto $b=141$ tendría un número impar de nitrógeno y el $a=224$ podría no tener nitrógeno/s o bien un número para de éstos.

Información científica.

En el Capítulo 4 la Química de la Planta de Coca nos referimos al contenido de alcaloides de las hojas de coca e hicimos mención a las concentraciones halladas por Johnson y col (1994): (**Tabla 5-8**)

HOJAS DE COCA (%)				
Alcaloide	Brote	7 días	5 semanas	36 semanas
Cocaína	0,18	0,75	0,61	0,39
Metilecgonina	0,47	0,78	0,59	0,32
Higrina	0,19	1,8	0,68	0,2
Tropinona	0,11	0,33	0,08	<0,05
t-cinamoilcocaína	0,19	3,9	0,31	>1,75
c- cinamoilcocaína	0,06	0,06	0,55	0,38
Cuscohigrina	0,23	1,97	0,52	0,25
Tropacocaína	0,05	0,12	0,05	<0,05

Tabla 5-8: Concentración de los alcaloides de la hoja de coca en distintos estadios de la hoja.

La **Tabla 5-8** muestra que la hoja de coca tiene otros dos alcaloides la higrina y la cuscohigrina en concentraciones similares a los tres alcaloides detectados en las muestras de orina de los mascadores de hoja y de los consumidores de cocaína: cocaína, metilecgonina o ecgonina metil éster y la cinamoilcocaína (tran y cis).

Por otro lado, Lüning B. y col en un Acta Chemica Scandinavica de 1965 publicaron un esquema con la fragmentación en espectrometría de masa de impacto electrónico de 70eV de la higrina. (**Figura 5-12**)

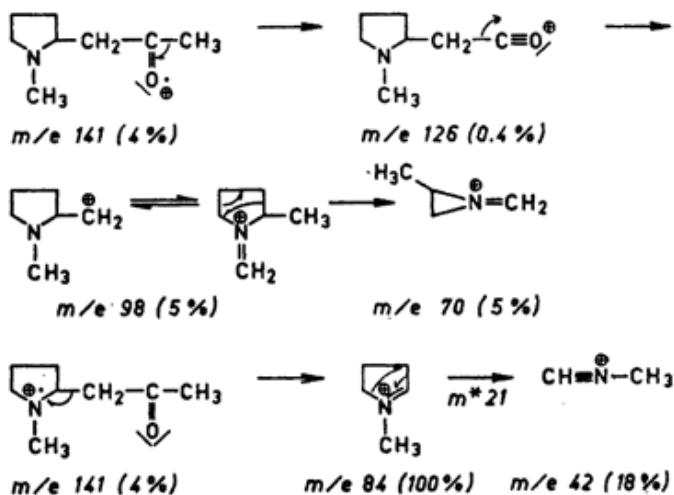


Figura 5-12: Esquema de la fragmentación del alcaloide higrina en espectrometría de masa según Lüning B. y col (1965).

La **Figura 5-12** muestra que los iones m/z que se forman luego de ionizar a la higrina por un haz de electrones de alta energía en la fuente de ionización al vacío de 70 eV son: 42, 70, 84, 98, 126. Correspondiéndole a la m/z 84 el 100% y al resto de los iones abundancias menores del 5% con excepción del ion m/z 42 que tiene una intensidad del 18% (este ion no fue detectado en nuestros trabajos estaba fuera del rango de análisis del instrumento de CGMS). Por lo que nuestro compuesto “b” tendría mucha coincidencia con la higrina.

No se halló en la bibliografía una fragmentación de la cuscohigrina de PM 224

Análisis de la correspondencia de los espectros de masa obtenidos en las orinas de los mascadores de hoja de coca con los alcaloides higrina y cuscohigrina. (Tabla 5-9)

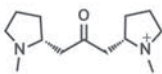
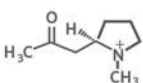
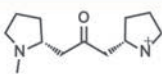
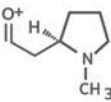
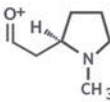
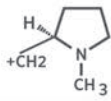
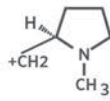
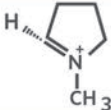
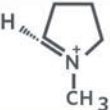
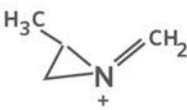
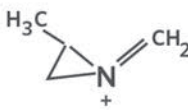
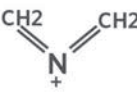
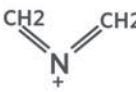
Compuesto "a"	CUSCOHIGRINA	Compuesto "b"	HIGRINA
ION 224		ION 141	
	PM 224 Número par de átomos de N		PM 141 Número impar de átomos de N
ION 209			
	Pérdida de un CH3		
ION 126		ION 126	
ION 98		ION 98	
ION 84		ION 84	
ION 70		ION 70	
ION 42		ION 42	
			CH ₃ -N ⁺ ≡CH

Tabla 5-9: Correspondencia de los iones hallados en los espectros de "a" y "b" y las estructuras de la cuscohigrina y la higrina.

Del análisis de la **Tabla 5-9** puede observarse que los iones hallados en los espectros de masa del compuesto “a”: 70; 84; 98; 126, 209 y “b”: 70; 84; 98; 126 perfectamente pueden ser parte de la estructura de la cuscohigrina y de la higrina respectivamente. La cuscohigrina en su estructura contiene a la estructura química de la higrina por lo que es lógico que comparta la mayor parte de los fragmentos de iones con la higrina incluso el pico base m/z 84. El ion 42 volvemos a reiterar no se observa en los espectros de masa de “a” y “b” de la **Figura 5-11** porque el rango de análisis del instrumento fue de 50 a 450 daltons.

Se volvió a inyectar posteriormente el compuesto “a” con un rango entre 40 a 450 daltons y se observa el ion m/z 42 que le sigue en abundancia al ion base m/z 84 como mencionaban Lüning B. y col (1965). **Figura 5-13.**

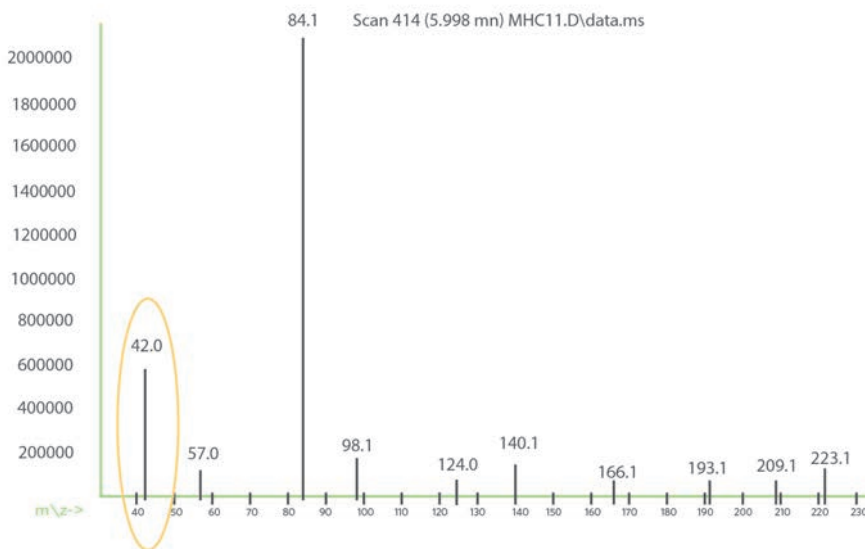


Figura 5-13: Espectro de masa del compuesto “a”.

Rango entre 40-450 daltons con el ion m/z 42.

5.4.2.2.3 Índice de retención de Kovats

Determinación aproximada del tiempo de retención (T_r) a partir del índice de retención (IR).

En cromatografía gaseosa el uso de los índices de retención como el de Kovats resultan ser un parámetro útil para intercambiar entre laboratorios independientemente del instrumento empleado. En el sistema de índice de retención (IR) diseñado por Kovats usa una serie homóloga de compuestos de cadena lineal (n-alcanos o n-parafinas) que se toman como referencia. El índice de retención para un alcano normal es el número de carbonos multiplicado por 100. Por ejemplo, n-dodecano (n-C₁₂H₂₆) se corresponde con $I = 1.200$. Si un soluto equivale a $I = 1.478$, se eluye después de n-C₁₄ y antes de n-C₁₅, y está más próximo a n-C₁₅. Los índices de retención normalizan las variables del instrumento para poder comparar los datos de retención en distintos sistemas de cromatografía de gases. Si se construye una curva de IR (se obtienen de la bibliografía para cada sustancia) vs tiempo de retención para una serie de compuestos en las condiciones de trabajo de nuestro método se obtendrá una relación lineal, así se puede ingresando el IR del nuevo compuesto a investigar conocer el tiempo de retención aproximado de aparición en las condiciones de nuestro ensayo (Clarke's 2004). El **Gráfico 5-2** muestra la curva obtenida cuando se grafica el IR vs tiempo de retención en las condiciones de trabajo del laboratorio de una serie de testigos indubitables de compuestos farmacéuticos y drogas de abuso.

EL tiempo de retención aproximado obtenido a través del uso del índice de retención de Kovats fue empleado para el compuesto “b”, al que relacionamos por su estructura con la higrina cuando se iniciaron los estudios sobre el tema de esta tesis. El IR de la higrina nos da que este compuesto debería tener un tiempo de retención en nuestras condiciones de 2,78 minutos vs el hallado en nuestras condiciones para el compuesto “b” de 2,52 minutos.

El IR de la cuscohigrina no se consiguió en la bibliografía.



Gráfico 5-2: Curva de calibración IR vs tiempo de retención (minutos).

La gráfica fue construida determinando el tiempo de retención (Tr) de testigos de drogas de abuso y fármacos, cuyos IR fueron obtenidos de la biblioteca MPM (Maurer_Pleger_Mayer), manteniendo siempre las mismas condiciones cromatográficas en todo el ensayo.

IR = 1109 (higrina)

Tr (calculado): 2,76 min.

Tr (experimental): 2,52 min.

A los fines identificatorios lo ideal hubiera sido hacer una curva IR vs Tr con alcanos de referencia y con el Tr de los compuestos “a” y “b” determinar el IR y así hacer la identificación.

5.4.2.2.4 Comparación con espectros obtenidos de extractos de hoja de coca.

Comparación espectros
masa con extractos
de hojas de coca

A los efectos de comprobar que “a” y “b” provenían de las hojas de coca se hicieron extractos de éstas y se compararon los cromatogramas y los espectros de masa con la orina de mascaadores de hojas de coca. Se halló coincidencia en los tiempos de retención y espectros de masa de ambos compuestos. (Figura 5-14).

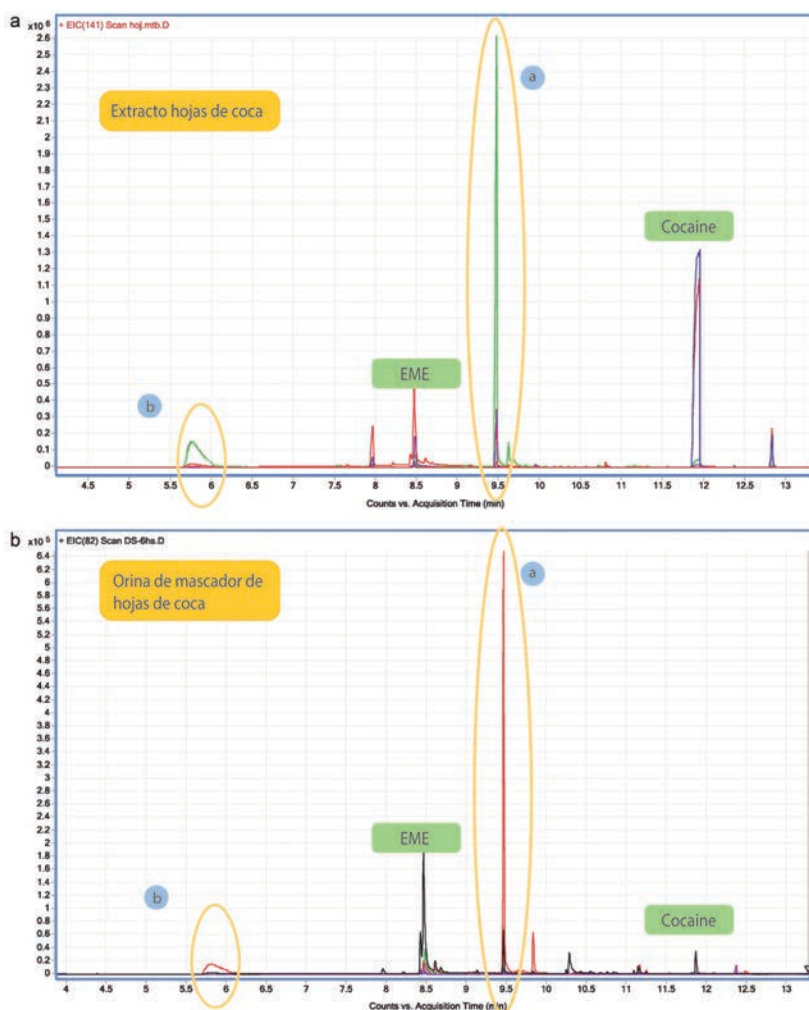


Figura 5-14: Cromatograma de hojas de coca y orina de un mascador de hojas de coca.

5.4.2.3 Confirmación estructural de los compuestos “a” y “b”.

5.4.2.3.1 Testigo indubitable.

Comparación
con testigo
indubitable.

El análisis de los espectros de masa y los datos analíticos de la bibliografía parecían indicar que los compuestos pertenecerían a dos alcaloides presentes en la hoja de coca derivados de

la pirrolidina, conocidos como higrina y cuscohigrina. No habíamos hallado información bibliográfica del análisis de estos dos compuestos en muestras de secuestro ni en muestras biológicas ni las habíamos detectado en muestras de secuestro analizadas en nuestro laboratorio ni en muestras de orina de consumidores de cocaína.

El análisis de testigos indubitables de higrina y cuscohigrina era un paso obligatorio para poder comparar con los espectros de nuestros desconocidos. Como mencionamos en el Capítulo 1 en “Configuración de la tesis”, estos compuestos no estaban disponibles comercialmente para ser empleados como testigos en los laboratorios. Se solicitó su síntesis a LGC de Milán Italia y a Toronto Research Chemicals, Inc de North York de Canadá. Ambos fueron nuestros proveedores del testigo de cuscohigrina durante nuestro trabajo. El testigo de higrina no se consiguió durante el desarrollo de esta tesis, las hojas de coca nos sirvieron como “testigo “de este compuesto en todas nuestras experiencias.

El testigo de cuscohigrina coincidió tanto en tiempo de retención como en su espectro de masa con nuestro compuesto “a”, habíamos resuelto favorablemente uno de nuestros desconocidos.

5.4.2.3.2 Cromatografía líquida con detector de masa tiempo de vuelo. (LC-QTOF-MS)

Determinación
masa exacta
(testigo y hojas
de coca).

5.4.2.3.2.1 Generalidades

En la **Figura 5-15** del diagrama general del funcionamiento de un QTOF-MS se ve que los iones entran cargados luego de sufrir una ionización en la fuente de ionización por electrospray (ESI), en el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona el/los iones precursores, estos atraviesan la celda de colisión (CID o Q2), llegan al pulsador de iones, que acelera los iones en el tubo de vuelo (TOF). Un espejo de iones en el extremo del tubo refleja los iones y los envía al detector que registra su tiempo de llegada.

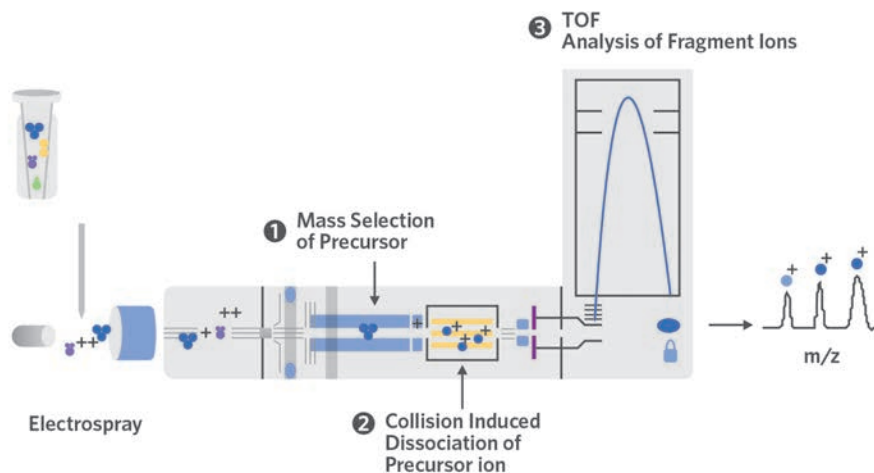


Figura 5-15: Diagrama general del funcionamiento de un QTOF-MS tándem. (Agilent)

El tiempo de vuelo (t) para cada masa es único y viene determinado por la energía (E) a la que un ion se acelera, la distancia (d) que tiene que viajar y la relación m/z .

$$m = 2E/v^2 \quad (1)$$

$$v = (2E/m)$$

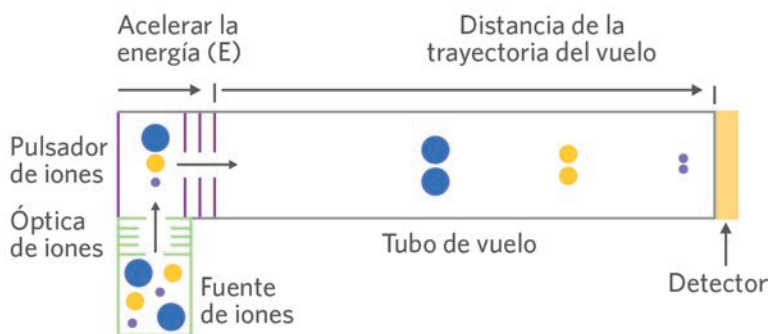


Figura 5-16: Time-of-Flight análisis de iones de carga única de diferentes masas.

La ecuación indica que, para una energía cinética dada, E , las masas

más pequeñas tendrán velocidades mayores que las masas más grandes. Los iones con masas menores llegarán antes al detector. **Figura 5-16.**

La velocidad viene determinada (y en consecuencia la masa) por la medida del tiempo que tarda un ion en alcanzar el detector. (Agilent 2011)

La segunda ecuación es velocidad (v) igual a la distancia (d) dividida por el tiempo (t):

$$V = d/t \quad (2)$$

Las ecuaciones (1) y (2) combinadas producen:

$$m = (2E/d^2)t^2$$

Para una energía (E) y distancia dadas, la masa es proporcional al cuadrado del tiempo de vuelo del ion. E y d se mantienen constantes y dan como resultado una variable A que simplifica la ecuación:

$$m = A * t^2$$

Para ser muy precisos, se debe considerar también un retraso del tiempo para aplicar la alta tensión:

$$t = t_m - t_0$$

Esto dará como resultado la ecuación final: (Agilent 2011)

$$m = A * (t_m - t_0)^2$$

Adquisición de datos:

Hay tres modos en los que el equipo híbrido QTOF-MS (AGILENT) puede ser configurado:

- **Modo MS:** pasan todos los iones en un rango de masa a través del instrumento, en este modo no hay fragmentación en la celda de colisión. Se especifica el rango de masa y la velocidad de adquisición y el tiempo para recolectar espectros.

🌿 **Modo Auto MS/MS (Q-TOF solamente):** en este modo se especifica el ion precursor que se desea que el cuadrupolo seleccione y que pase a la celda de colisión para su fragmentación. Se pasan todos los iones productos por el TOF y el analista selecciona luego que espectros de los iones productos originados en el TOF desea analizar. Se pueden emplear varias energías de colisión.

🌿 **Modo Targeted MS/MS:** este modo se emplea cuando se conoce el compuesto y se coloca el ion precursor y se varía la energía de colisión hasta optimizar la abundancia del ion producto.

En nuestra experiencia las muestras de pelo fueron analizadas empleando un cromatógrafo líquido con detector híbrido QTOF-MS que se operó en modo MS y auto MS/MS en combinación con una librería y base de datos. La librería fue confeccionada con masas exactas de fragmentos provenientes del CID (collision-induced dissociation) de 2500 compuestos tóxicos (139 son metabolitos obtenidos de testigos puros) a tres diferentes energías de colisión (10, 20 y 40 eV), estos datos fueron incluidos en una base de datos TOF-MS con fórmulas moleculares de más de 7.500 sustancias a partir de las cuales se calculan las masas precisas y el patrón de isótopos, además, el software MassHunter posee entre otras, una herramienta que permite calcular probables metabolitos a partir de la masa exacta del posible compuesto por procedimientos de sustracción o adición (ej. hidroxilación = + O, demetilación = - CH₂) (Broecker S. y col. 2011), en nuestro estudio se analizó además, el testigo de cuscohigrina y un extracto de hoja de coca como testigo de higrina en las mismas condiciones. Una fuente de ionización de baja energía, ESI positiva fue empleada, donde las formas protonadas [M+H]⁺ fueron seleccionadas por el cuadrupolo con una resolución de masa de 1.3 m/z. En el modo MS el cuadrupolo deja pasar los iones en un rango de masas de 100 a 1000 m/z con una precisión de masa <3 ppm, la energía CID en este modo fue 0. En modo auto MS-MS se seleccionaron los iones precursores con $\Delta m/z = 4$, en un rango de masas 50–600 m/z, la energía CID se incrementó en función de la masa. En el análisis toxicológico sistemático se utilizó el modo auto-MS-MS (adquisición dependiente de los datos) con un tiempo de ciclo de 1,1 s, medición de

0,25 s en modo MS, todos los iones que entran a la fuente de ionización pasan al TOF, se obtiene el espectro de masa total del compuesto protonado y su tiempo de retención, se seleccionan 3 tres precursores (iones) de masas más abundantes, que se fragmentan según una energía de colisión dependiente de la masa.

Energía de colisión = $(4 + 0,06 \text{ m/z}) \text{ eV}$ y se miden en el TOF estos fragmentos (modo MS-MS) durante el tiempo restante del ciclo, luego el ciclo se inicia nuevamente. Al final se tendrá las masas moleculares exactas y la fórmula molecular de los compuestos y de sus fragmentos obtenido en CID. (Broecker S. y col. 2011 y 2012).

Si bien la energía de colisión aplicada a la molécula desconocida suele ser diferente de la empleada en la obtención de la biblioteca, 10, 20 o 40 eV, cuando se hacen las comparaciones las mayores coincidencias se dan con los espectros del desconocido obtenidos a energías de colisión cercanas a las empleadas en la biblioteca, esto se debe a que la coincidencia de las masas de fragmentos precisas es una indicación de identidad más fuerte que la proporción de abundancia.

5.4.2.3.2.2 Determinación de la masa exacta de la higrina y cuscohigrina.

Hasta el momento que se realizó esta medición no se habían encontrado referencias de las mediciones de la higrina y cuscohigrina por LCMSMS y/o LC-QTOF-MS.

La descripción de la columna empleada (HILIC) en estos estudios será objeto de un apartado posterior.

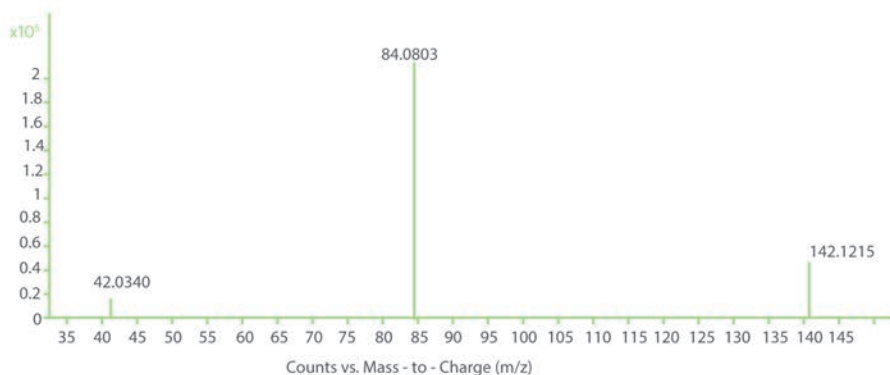


Figura 5-17: Espectro de masa exacta de la Higrina (hoja de coca). CID 3 eV.

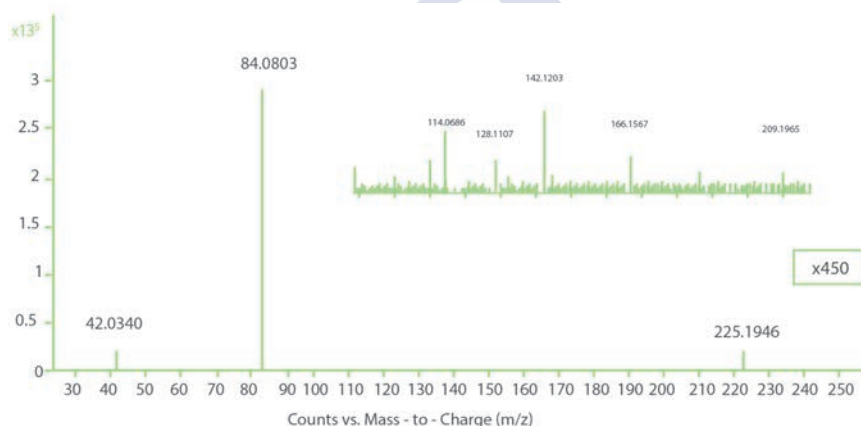


Figura 5-18: Espectro de masa exacta testigo de Cuscohigrina. CID 3 eV.

Los espectros de masa de la higrina y cuscohigrina (**Figuras 5-17** y **5-18**) muestran mayoritariamente el ion 84,0803/84,0808 (proveniente del catión $\Delta 1$ - dihydropyrrolium) y el ion m/z 42,0340 correspondiente a un fragmento $[\text{CH}_2=\text{N}=\text{CH}_2]^+$ o $[\text{CH}_3-\text{N} \text{ CH}]^+$. Ambos iones también fueron visualizados en los espectros de masa cuando se empleó cromatografía gaseosa con un analizador de masa de un cuadrupolo y una fuente de ionización al vacío de 70eV.

En el espectro de masa de la cuscohigrina (**Figura 5-18**) se observan otros iones m/z de muy baja intensidad (amplificados x450): 114,0686;

128,1107; 142,1203; 166,1567; 209;1965 que permiten hacer un esquema tentativo de la fragmentación de la cuscohigrina (**Figura 5-19** Esquema fragmentación cuscohigrina)

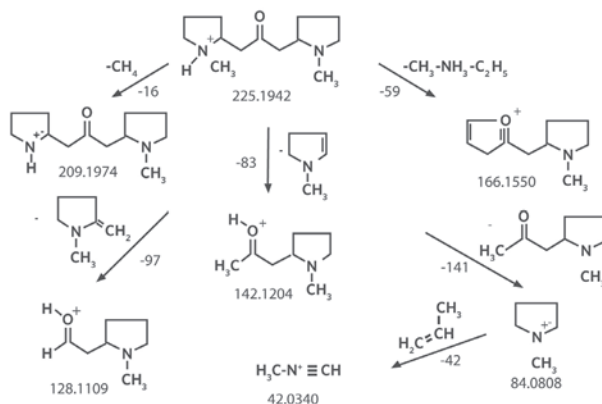
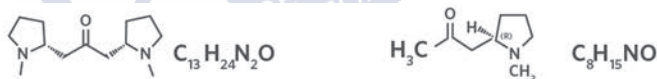


Figura 5-19: Esquema de la fragmentación de la cuscohigrina.

La **Tabla 5-10** muestra el cálculo de la masa exacta de la cuscohigrina e higrina y su comparación con la masa medida en el LC-QTOF-MS.



Átomo	Masa del átomo	Nº de átomos	Subtotal
Hidrógeno	1,00783	24	24,18792
Carbono	12	13	156
Nitrógeno	14,00307	2	28,00614
Oxígeno	15,99492	1	15,99492
TOTAL			224,18898
más H			1,00783
			225,19681
menos e			0,00055
CALCULADO			225,19626
LC_QTOF-MS	MEDIDO		225,1946

Nº de átomos	Subtotal
15	24,18792
8	156
1	28,00614
1	15,99492
TOTAL	141,11544
más H	1,00783
	142,12327
menos e	0,00055
CALCULADO	142,12272
MEDIDO	142,1215

Tabla 5-10: Cálculo de la masa exacta de la cuscohigrina y la higrina.

5.4.2.3.2.3 Hallazgo de dos metabolitos de la cuscohigrina. (CUS-M1 y CUS-M2).

Al realizar el análisis de los cromatogramas obtenidos por el LC-MSMS de las muestras de pelo de los mascadores de hoja de coca (26 muestras) y de los consumidores de cocaína (22 muestras) se hallaron en las muestras de pelo de los mascadores de hoja de coca, dos picos con iguales transiciones que la cuscohigrina ($m/z=84$ y $m/z=42$) pero con distintos tiempos de retención: CUS-M1= 12,4 minutos y CUS-M2= 15,2 min mientras que la cuscohigrina salía a 17 minutos. Estos dos compuestos que podrían corresponder a dos posibles metabolitos de la cuscohigrina con un tiempo de retención menor, no fueron detectados en los consumidores de cocaína ni en los extractos de hoja de coca.

A efectos de determinar la masa exacta de estos dos compuestos CUS-M1 y CUS-M2 se pasaron en iguales condiciones cromatográficas por el LC-QTOF-MS.

Los resultados se muestran en la **Figura 5-20**, al igual que sus posibles estructuras químicas.

El metabolito CUS-M1 (12,4 min.) con un $m/z= 241.1899$ [M+H], $C_{13}H_{24}N_2O_2$, no fue detectado en las muestras de pelo de todos los mascadores de hoja de coca, si fue positivo en todas las muestras de pelo el segundo metabolito CUS-M2 (16,2 min.) $m/z=225.1615$ [M+H], $C_{12}H_{20}N_2O_2$. Recordemos que la ionización es por ESI y la molécula se carga positivamente por el agregado de un protón, por lo que al valor m/z obtenido hay que restarle un H para obtener el peso molecular del compuesto.

En los dos espectros de CUS-M1 y CUS-M2 el pico base es $m/z = 84,0818$ y el ión $m/z 42,0373$ (no se observa en el espectro CUS-M1), ambos presentes también en el espectro de la cuscohigrina. Un pico extra detectable en el metabolito CUS-M1 de $m/z= 158,1167$ cuya estructura tentativa se muestra en la **Figura 5-20**.



A modo de resumen de los resultados hallados en cada uno de los pasos de la identificación tentativa y la confirmación estructural de los compuestos “a” y “b” que a estas alturas ya están identificados como CUSCOHIGRINA e HIGRINA respectivamente, se muestran en las **Figuras 5-21 y Figura 5-22**.



Figura 5-21: Pasos de la identificación tentativa de los compuestos “a” y “b”.

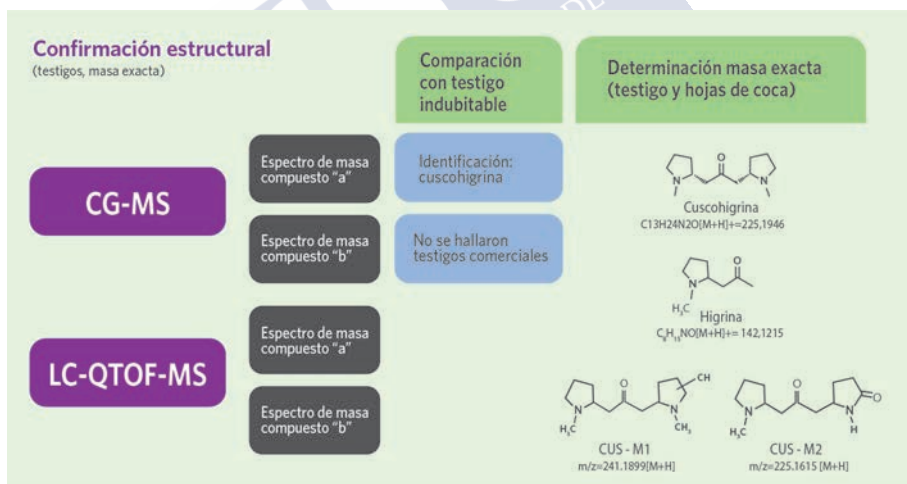


Figura 5-22 Pasos de la confirmación estructural de los compuestos “a” y “b”.

5.4.3 La elección de las columnas HILIC (hydrophilic interaction chromatography), paso fundamental para la separación de la higrina y cuscohigrina en un LCMSMS y LC-QTOF-MS.

La elección de la columna, fue un paso imprescindible para establecer la identidad de los dos compuestos investigados, “a” y “b”, a partir de la determinación de su masa exacta por un LC-QTOF-MS y posteriormente para estudiar el comportamiento de la higrina y cuscohigrina en otras matrices biológicas como el pelo y fluido oral con el uso de un LCMSMS. Para ello, fue necesario buscar una columna que nos permitiera separar la higrina y la cuscohigrina pero que también fuera eficiente para el análisis de los alcaloides tradicionales de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína (cocaína, ecgonina metil éster, benzoilecgonina, anhidroecgonina metil éster, cinamoilcocaína, tropococaína, norcocaína.). Además, al igual que la cocaína, ecgonina metil éster o benzoilecgonina era esperable que la higrina y cuscohigrina estuvieran en el rango de los ng/mL o menor, por lo que el desarrollo de los métodos tanto en pelo como en fluido oral debían hacerse con técnicas más sensibles que la cromatografía gaseosa con detector de masa simple cuadrupolo (CGMS).

Las técnicas que se utilizaron fueron: la cromatografía líquida con detector de triple cuadrupolo (LCMSMS) y la cromatografía líquida con masa híbrido simple cuadrupolo con analizador de tiempo de vuelo (LC-QTOF-MS) para determinar masa exacta, una breve descripción de ambas fue dada previamente. La elección de la columna fue uno de los inconvenientes en el desarrollo de estos métodos, por lo que un detalle de la columna HILIC, como los parámetros de pH de la fase móvil, concentración de buffer y distintas interacciones que gobiernan en la separación de los solutos, como así también de cómo se llegó a la decisión de emplear este tipo de columnas en nuestros estudios y las dificultades encontradas, serán discutidos.

5.4.3.1 Generalidades de las columnas HILIC.

El término “hydrophilic interaction chromatography” (HILIC)—fue acuñado por Alpert A. en 1990, como un acrónimo en lugar de HIC que

ya había sido empleado para el término “Hydrophobic-Interaction Chromatography”. En este tipo de columnas de cromatografía hidrofílica se emplea una fase móvil hidrofóbica conteniendo una mezcla de una apreciable cantidad de agua (al menos 2,5vol.%) y un solvente menos polar. típicamente > 70% de acetonitrilo, en las que la retención aumenta con la hidrofilidad de los solutos. Ésta es una variante de la cromatografía de fase normal, pero los mecanismos de separación son más complicados. Como en las fases normales (NP-LC) las columnas HILIC emplean una fase estacionaria de sílica, amino o ciano, pero las fases móviles empleadas por las columnas HILIC son similares a las fases reversas de la cromatografía líquida (RP-LC) y además permiten la separación de compuestos cargados como las cromatografías iónicas (IC). (Buszewski B. y col 2012) **Figura 5-23.**

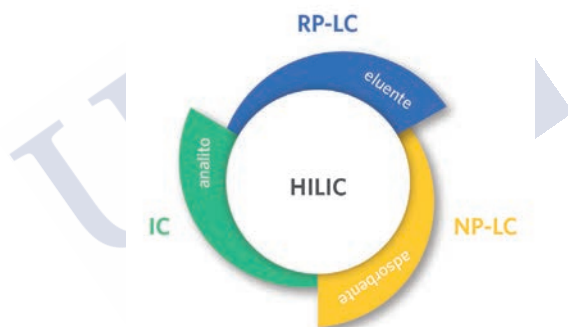


Figura 5-23: Relación HILIC con las otras fases.

Cavazzini A. y col. (2017), Buszewski B. y col. (2012), mencionan una serie de ventajas de las columnas HILIC, como alternativa a las cromatografías de fase normal o reversa a saber:

Los solventes empleados son similares a los usados en la cromatografía en fase reversa, por un lado, favorece la interfaz con los espectrofotómetros de masa y en especial el acetonitrilo mejora la ionización en los detectores de masa que usan ionización por electrospray (ESI) aumentando la sensibilidad de la detección, por otro lado, tampoco es necesario con el uso de las columnas HILIC tener equipos dedicados a

una tarea específica como con el uso de las fases normales. HILIC tiene ventajas para la separación de compuestos hidrofílicos con respecto a las fases reversas y trabaja a bajas presiones porque los solventes empleados tienen baja viscosidad (acetonitrilo) lo que permite su uso a mayor velocidad dando gráficas aplanada de Van Deemter lo que permite además usar columnas más largas, esto es una diferencia con las columnas de fase reversa. La columna HILIC permite también la inyección de las muestras biológicas directamente, sin la necesidad de evaporar, por ejemplo, el sobrenadante obtenido luego de una precipitación con proteínas con acetonitrilo. La cromatografía líquida de interacción hidrofílica se ha establecido como el modo de separación elegido para compuestos altamente hidrofílicos y anfífilos sin carga que son demasiado polares para ser retenidos en RP-LC, pero no tienen carga suficiente para permitir una retención electrostática efectiva en la cromatografía de intercambio iónico. La separación HILIC actualmente está atrayendo mucho interés ya que resuelve muchos problemas de separación que antes eran difíciles, como la separación de pequeños ácidos orgánicos, medicamentos básicos y muchas otras sustancias neutras y cargadas.

5.4.3.2 Tipo de fases HILIC.

Típicamente las fases estacionarias de las columnas HILIC consisten en una fase de sílica (bare silica) sobre la que se adicionan grupos: diol, ciano, amino etc. fases estacionarias basadas en polímeros también pueden ser usadas. Algunas de las fases estacionarias HILIC se muestran en la **Tabla 5-11**.

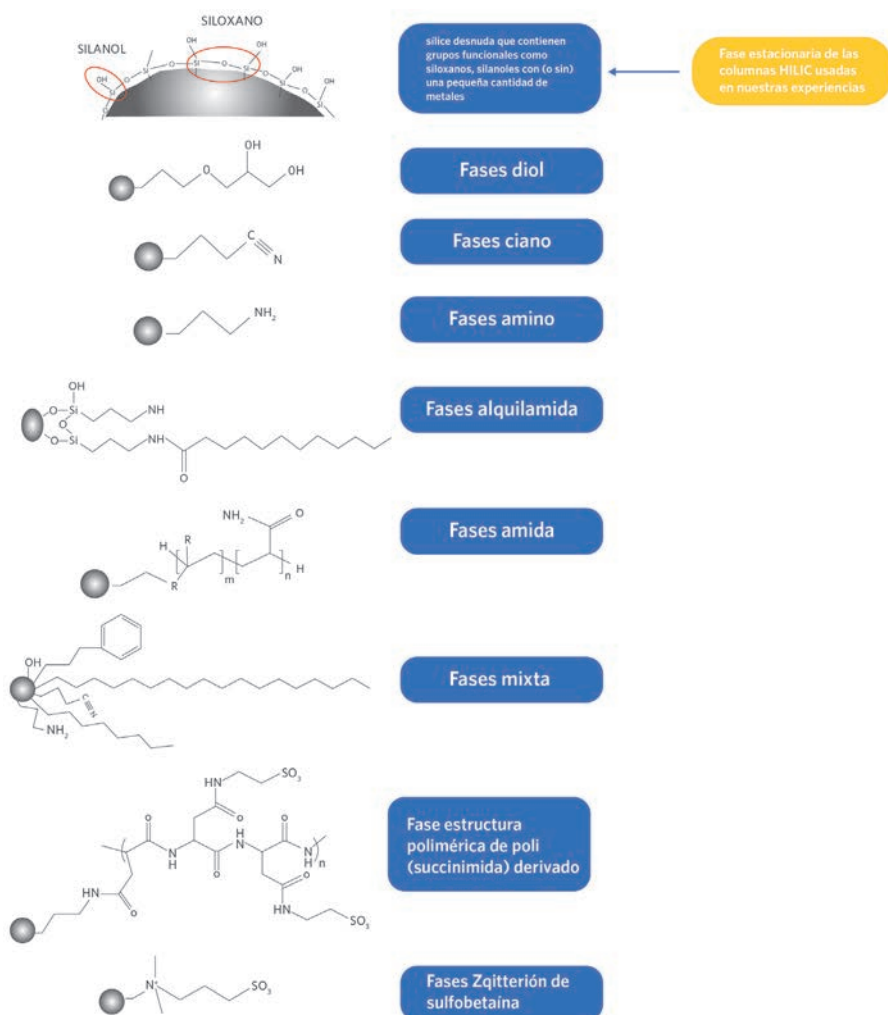


Tabla 5-11: Fases estacionarias de las columnas HILIC.

La fase estacionaria de la columna HILIC empleada en nuestros análisis fue una superficie de sílice que contiene grupos funcionales como siloxanos, silanoles. La sílice amorfa con una estructura porosa tiene tres tipos de silanoles en la superficie: aislados, germinales (dos hidroxilos unidos a un silicio) y vecinal (hidroxilos unidos por puente). La superficie también contiene expuestos enlaces siloxano (Si-O-Si). Los silanoles se consideran sitios de fuerte adsorción, mientras que los

sitios de siloxano generalmente se consideran hidrófobos. El par de electrones del oxígeno del siloxano (Si-O-Si) interacciona con los electrones π de los analitos a ser separados, pero es poca la intervención de los grupos siloxanos en la retención del compuesto. Nawrocki, J. 1997.

5.4.3.3 Mecanismos de interacción de las columnas HILIC.

Los mecanismos de retención de las HILIC son una combinación de partición entre la fase acuosa asociada a la fase estacionaria de superficie hidrofílica y los solventes orgánicos de la fase móvil. Los grupos hidrofílicos en la superficie de la fase estacionaria retienen fuertemente las moléculas de agua de la fase móvil, formando una capa acuosa que permanece estancada en ella. Así, un analito polar disuelto en la fase móvil sufre un mecanismo de partición entre las dos fases líquidas: la capa acuosa inmovilizada en la superficie de la fase estacionaria y la fase móvil rica en materia orgánica. Como regla general, la retención en HILIC se rige principalmente por este mecanismo de partición propuesto por Alpert. **Figura 5-24.**

Además, otras interacciones como las uniones hidrógeno (adsorción), las dipolo-dipolo y las electrostáticas y aún las hidrofóbicas también pueden desempeñar un papel en la retención de los compuestos en las HILIC (Rodríguez-Gonzalo y col. 2018).

La existencia de otras interacciones además de la partición, como la adsorción e interacciones electrostáticas entre la fase móvil-fase estacionaria hacen importante considerar la composición de la fase móvil, la fuerza iónica y el pH de las soluciones tampón y la temperatura. Se ha hecho un ranking de importancia basado en un enfoque estadístico, de qué

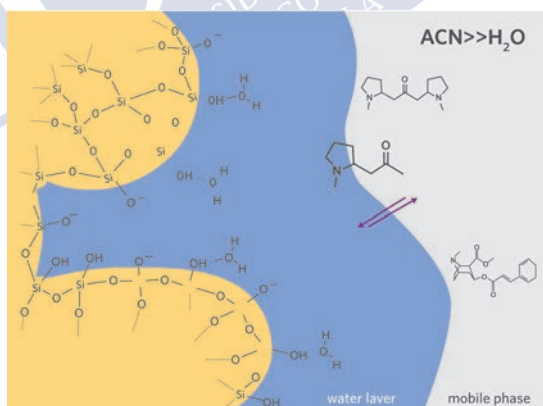


Figura 5-24: Mecanismo de partición en columna HILIC.

parámetros operativos de las HILIC afectan más la retención y la selectividad en estas columnas.

- Para la **retención** el orden de importancia fue observado: contenido orgánico de la fase móvil > fase estacionaria > temperatura ~ pH fase móvil (por ejemplo, pH 3-6 pueden afectar el grado de ionización del analito) ~ concentración del tampón.

- Para la **selectividad**: la naturaleza de la fase estacionaria > pH de la fase móvil > concentración del tampón > temperatura > contenido orgánico de la fase móvil. La selectividad puede ser modificada cambiando el pH de la fase móvil porque no solamente cambia el estado de la ionización de los grupos silanol de la fase estacionaria sino también el estado de ionización de los analitos. (Mc Cally 2007)

Los factores de los que depende el mecanismo de separación dependerán de las propiedades de la fase estacionaria, de la fase orgánica hidroorgánica y de la estructura de los compuestos investigados. Muchas veces definir que mecanismo es el que prepondera no es un trabajo sencillo de elucidar.

5.4.3.4 Fase móvil, concentración de sales, pH y temperatura: cómo afectan en la elución de los analitos.

• Fase móvil.

El acetonitrilo es el típico solvente empleado como fase móvil en las separaciones en las columnas HILIC. El acetonitrilo se puede mezclar con otros solventes con mayor fuerza de elución.

Solventes de fuerza de elución decreciente:

metanol > etanol > isopropanol > tetrahidrofurano > acetonitrilo.

Siendo el acetonitrilo un solvente aprótico, de bajo poder de elución y miscible con el agua que tiene fuerte poder de elución hacen que sean una mezcla óptima. El contenido inicial de acetonitrilo debe ser superior a 90% y no mayor a 98%. Como el acetonitrilo es muy miscible en agua, solo los contenidos superiores al 90% conducen a una capa de agua, que se adsorbe a la superficie polar de la fase estacionaria, cuando el contenido de agua de la fase móvil aumenta, (lo recomendable a no más del 40%) se produce un colapso de la lámina de agua adsorbida sobre la fase

estacionaria que se mezcla completamente con el agua que pasa y ya no se produce la partición entre la fase móvil y la fase acuosa adsorbida a la fase estacionaria y se produce la elución de todos los analitos. (McCalley, D.V. 2007; Letzel, T. 2019)

Para volver a formarse nuevamente la capa de agua sobre la fase estacionaria es necesario pasar entre 20 a 30 volúmenes de columna para alcanzar el equilibrio, lo que puede lograrse aumentando la velocidad del flujo, porque más que el tiempo lo importante son los volúmenes de fase móvil con las proporciones iniciales que se pasan. (Letzel, T 2019)

■ Sales

Las sales que se emplean con las columnas HILIC son generalmente acetato de amonio, formiato de amonio o bicarbonato de amonio, son sales muy solubles en acetonitrilo y por su volatilidad pueden ser empleadas en espectrometría de masa. El formiato de amonio es una sal más ácida que el acetato de amonio.

Las sales se agregan a la fase móvil para controlar las interacciones electrostáticas entre analitos cargados y la fase estacionaria cargada. Además, esto también conduce a picos de elución con menos tailing.

El aumento de la sal incrementa la capa de agua adsorbida a la fase estacionaria de la columna, por otro lado, la fase móvil orgánica empuja a la sal a la capa acuosa, al aumentar el espesor de la capa acuosa también se aumenta la retención de los analitos polares incluso los neutros. Por lo tanto, un gradiente de sal decreciente tendría el efecto de aumentar el contenido de fase móvil orgánica con mayor fuerza de elución.

En el caso de moléculas cargadas, al aumentar el contenido de sal en la fase móvil se produce una disminución de la interacción electrostática entre el analito con la fase estacionaria cargada o zwitteriónica, conduciendo a una reducción de la retención del analito correspondiente, comparado con concentraciones de sal más bajas que producirán tiempos de retención más prolongados por el aumento en la interacción electrostática entre el analito y la fase estacionaria. (Letzel, T 2019)

■ pH

El pH es un factor importante que debe ser considerado cuando se

emplea una columna HILIC, muchos compuestos separables por estas columnas estarán con o sin carga dependiendo el pH de la fase móvil, por lo tanto, es importante que el analito a separar esté en una forma que sea separable y estable en las condiciones del ensayo. Las fases estacionarias en particular las de sílica dependen del pH su estado de protonación. Con valores de pH por debajo de 4 o 5 estará totalmente protonada, por lo tanto, no dará lugar a interacciones electrostáticas con el analito, si el pH se incrementa por arriba de 5 la sílica podrá estar parcialmente protonada y puede haber interacción electrostática modificando los tiempos de retención. (Letzel, T 2019). McCalley, D.V (2007) encontró que variaciones de pH entre 3 a 4,5 en columnas de sílica no varían significativamente la retención de bases cargadas.

■ **Temperatura**

Es de preveer que un aumento en la temperatura de la columna tendrá disminuciones en los tiempos de retención de los analitos.

La temperatura de la columna es un parámetro importante en la separación HILIC y afecta la viscosidad de la fase móvil, la difusividad del analito y la energía para la partición del analito entre la fase móvil y la capa de agua en las fases estacionarias. (Letzel, T. 2019)

5.4.3.5 El desarrollo de los métodos para la búsqueda de higrina y cuscohigrina en pelo y fluido oral empleando cromatografía líquida triple Q y columnas HILIC.

Una vez que tuvimos nuestros marcadores higrina y cuscohigrina identificados en orina por la técnica de CGMS, era lógico seguir la evaluación de estos dos marcadores en otras matrices de uso forense como el pelo y el fluido oral. La cromatografía líquido masa acoplada a un triple cuadrupolo es hoy en día la técnica de elección por su alta sensibilidad para el análisis de muestras de pelo y fluido oral como ya mencionamos anteriormente.

No se hallaron referencias bibliográficas sobre el análisis de estos dos alcaloides por LCMSMS en ninguna de estas dos matrices.

Había que buscar entonces:

- Columna a emplear, fases móviles, temperatura de la columna.

- Los parámetros cromatográficos como:
- transiciones a monitorear, o sea los iones productos a partir de los iones padres de higrina y cuscohigrina (M^+) a ser monitoreados, empleando el método de adquisición multiple reaction monitoring (MRM),
- las condiciones de fragmentación en el proceso conocido como collision-induced dissociation (CID) que se produce en el segundo cuadrupolo o Q2 con el empleo de un gas inerte como nitrógeno (en nuestros análisis),
- que nuestro método de preparación de la muestra pudiera acoplarse a las condiciones instrumentales y
- que el método empleado en la preparación de muestras fuera hábil en extraer los dos compuestos de interés

Nuestro objetivo era lograr un sistema con condiciones reproducibles, con un límite de detección adecuado (este era un dato que no teníamos, no conocíamos el comportamiento de nuestros marcadores ni en el pelo ni en el fluido oral) y por supuesto que se adecue a la disponibilidad analítica del laboratorio. A diferencia de nuestros primeros ensayos con CGMS ahora conocíamos los compuestos que debíamos buscar.

Los primeros ensayos fueron dirigidos a intentar detectar estos dos compuestos siguiendo los métodos que el laboratorio, donde se desarrollaron los estudios, empleaba de rutina para análisis de drogas de abuso con columnas de fase reversa.

Las columnas de fase reversa no fueron adecuadas para la separación de la higrina y cuscohigrina, estos compuestos no fueron visualizados. Suponíamos que no eran retenidos por la hidrofobicidad de la fase y salían con el frente del solvente, algo similar ocurre con metabolitos polares de la cocaína como la metilecgonina que es pobremente retenido por las columnas de fase reversa o la benzoilecgonina que requiere ser derivatizada para su análisis, el Log P volvió a ser un parámetro a ser considerado y por esta razón se empezó a pensar en usar una columna de intercambio hidrofílico como las HILIC.

¿Para qué compuestos se emplea una columna HILIC?

Para aquellos que tienen un LogP aproximadamente de 0 o menor.

Como se observa en la **Figura 5-25** los nuevos compuestos a investigar higrina y cuscohigrina cumplían con las características, pero también los metabolitos de la cocaína: benzoilecgonina, ecgonina, metilecgonina. Cocaína y anhidroecgonina metil ester fueron analizadas en columnas HILIC de sílica en un trabajo previo de Giroud C y col (2014) en sangre y tejido, era de suponer que cinamoilcocaína y tropococaína fueran también separadas por tener similares Log P que la cocaína. **Figura 5-25** muestra la ubicación de los compuestos investigados en el rango de uso de las columnas HILIC y de fase reversa.

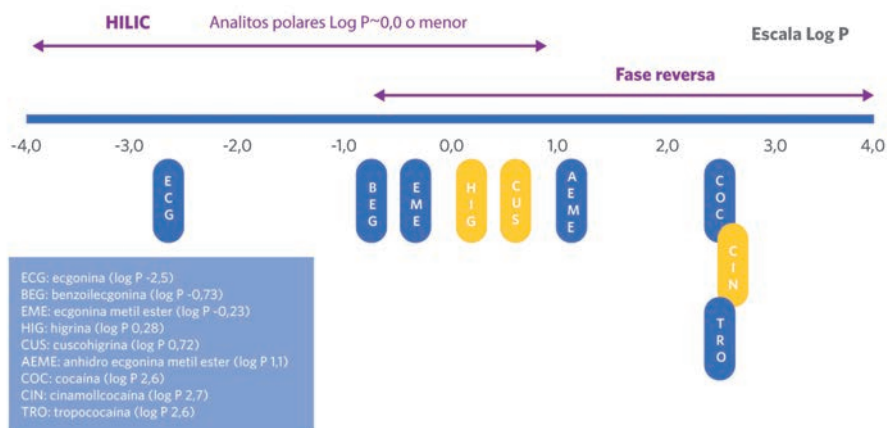


Figura 5-25: Relación Log P y uso de las columnas HILIC.

Se seleccionó para trabajar una columna de interacción hidrofílica (HILIC) de polisiloxano sin grupos funcionales. Se trabajó a un pH de 4,2 y como sal se empleó la sal de formiato de amonio a dos concentraciones 100 mM y 20 mM.

❖ **La sal de formiato de amonio es ligeramente ácida (pH ~5,3).**

El empleo de la columna HILIC a pH~5,3 sin ajustar, no permitía que la cuscohigrina eluyera de la columna, suponíamos que la misma quedaba adsorbida a la fase estacionaria retenía por la interacción electrostática entre los grupos OH de los silanoles que están cargados negativamente a ese pH, y la cuscohigrina cargada positivamente en sus dos grupos + NH-CH₃. El pK_a de la cuscohigrina es de ~ 9,8, al pH 5,3

estará cargada positivamente. En la **Figura 5-26** se esquematiza la posible interacción y el cuadro de la contribución de los distintos mecanismos de interacción fase estacionaria-analito en estas condiciones.

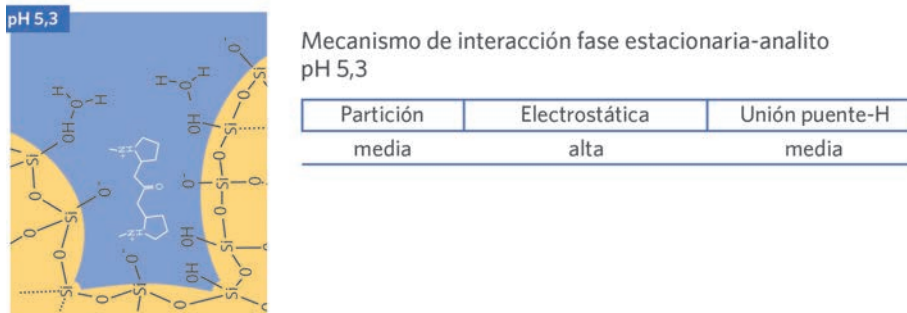


Figura 5-26: Representación de la interacción electrostática de la cuscohigrina con los grupos silanol de la fase estacionaria a pH 5,3.

pH 4,2 ajustado con ácido fórmico.

Al bajar el pH a 4,2 los grupos OH de los silanoles no estarán cargado y por lo tanto el mecanismo de interacción electrostática de la cuscohigrina será muy bajo, esto hizo que eluyera a un tiempo de 12 minutos aproximadamente.

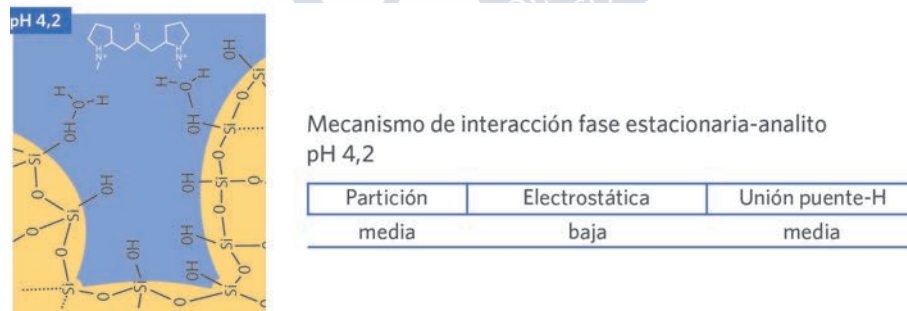


Figura 5-27: Representación de la interacción electrostática de la cuscohigrina con los grupos silanol de la fase estacionaria a pH 4,2.

• Modificación de la fase móvil, variando la concentración de la sal de formiato de amonio y agregando al acetonitrilo un solvente de mayor fuerza elución como el metanol en una relación ACN: METOH (4:1)

Los análisis de las muestras de pelo y fluido oral se realizaron por

LCMSMS empleando una columna HILIC de polisiloxanos, variando las condiciones de la fase móvil, se disminuyó la concentración de la sal de formiato de amonio y se agregó metanol al acetonitrilo.

El aumento de la sal de formiato de amonio en la fase móvil, como vimos anteriormente, tiene como efecto el aumento de la capa de agua adsorbida a la fase estacionaria, esto aumenta el mecanismo de partición, aumentando la retención del compuesto dentro de la columna y por otro lado disminuye las interacciones electrostáticas. Era de esperar por lo tanto que con menores concentraciones de formiato de amonio (20 mM), menor será la capa acuosa sobre la fase estacionaria y la fase orgánica tendrá mayor poder de elución potenciada con la mezcla del metanol de superior fuerza de elución que el acetonitrilo, la consecuencia fue un cromatograma acortado prácticamente a la mitad. La cuscohigrina que es el último compuesto en eluir sale a 11,65 minutos vs 17 minutos con la fase móvil con 100 mM de formiato de amonio y sin metanol. (**Tabla 5-12**)

Obtuvimos con este cambio un tiempo de corrida más corto y trabajar con menor concentración de sal que es más satisfactorio para el cuidado del sistema cromatográfico.

Análisis de pelo		Análisis de fluido oral	
Fase móvil A: Formiato de amonio 100mM		Fase móvil A: Formiato de amonio 20mM	
Fase móvil B: acetonitrilo		Fase móvil B: acetonitrilo: metanol (4:1)	
	Tipo retención (min)		Tipo retención (min)
Norcocaína	6,7	Benzoilecgonina	2,62
Cinamoilcocaína	7	Cinamoilcocaína	2,64
Cocaína	7,5	Cocaína	2,67
Cocaetileno	7,8	Cocaetileno	2,8
Tropococaína	8,8	Higrina	3,53
Benzoilecgonina	9,8	Tropococaína	3,75
Higrina	10,3	Metiletilecgonina	4,21
Metiletilecgonina	10,5	Cuscohigrina	11,65
Cuscohigrina	17	Norcocaína	-

Tabla 5-12: Tiempos de retención de los compuestos analizados.

La benzoilecgonina es un compuesto zwitterión, o sea que contiene un grupo ácido (COOH) y un grupo básico (HNCH_3) (y son, por tanto, anfóteros) existiendo como iones dipolares en ciertos intervalos de pH. La **Figura 5-28** muestra la benzoilecgonina dependiendo del pH como catión, zwitterión y anión.

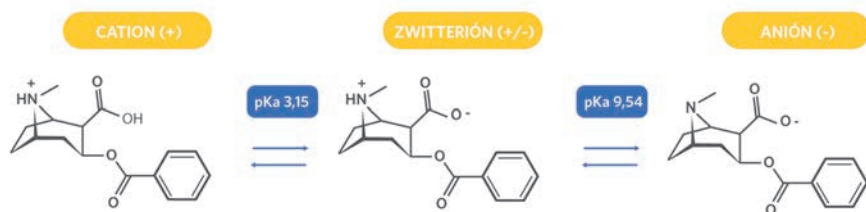


Tabla 5-28: Estados de ionización de la benzoilecgonina según el pH.

A pH 4,2 estará en la forma zwitterión, o sea con una carga positiva y otra negativa, entendiéndose que la carga neta es 0, tiene en esta condición menor polaridad que el resto de los compuestos analizados que a ese valor de pH estarán cargados positivamente y serán más retenidos por la fase acuosa de la columna mientras que la benzoilecgonina será eluida más tempranamente con la mezcla acetonitrilo: metanol y formiato de amonio 20 mM que la cocaína. Al aumentar la concentración del formiato de amonio a 100 mM la interacción electrostática interna de la molécula de benzoilecgonina disminuiría o sería interrumpida (Buszewski B. y col. 2012) y particionaría en mayor medida con la fase acuosa aumentando su retención y saliendo por detrás de compuestos menos polares como cinamoilcocaína, cocaína, cocaetileno y tropococaína.

En las **Figura 5-29** y **Figura 5-30** se muestra cómo va siendo el desarrollo en la columna HILIC con el gradiente de solvente empleado en el análisis de las muestras de pelo y fluido respectivamente, hasta la elución del último compuesto que es la cuscohigrina que eluye aumentando la proporción de agua en la fase móvil. En el caso del desarrollo del método de fluido oral la proporción de H_2O : ACN se llevó a 60%: 40%, y se aumentó la velocidad a 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ para poder eluir la cuscohigrina, esta proporción de agua fue superior al 40% recomendado, por

lo que tuvimos que controlar que no se produjera condensación de agua en el “curtain plate” de la fuente de ionización y el aumento de presión fuera resistido por las tuberías.

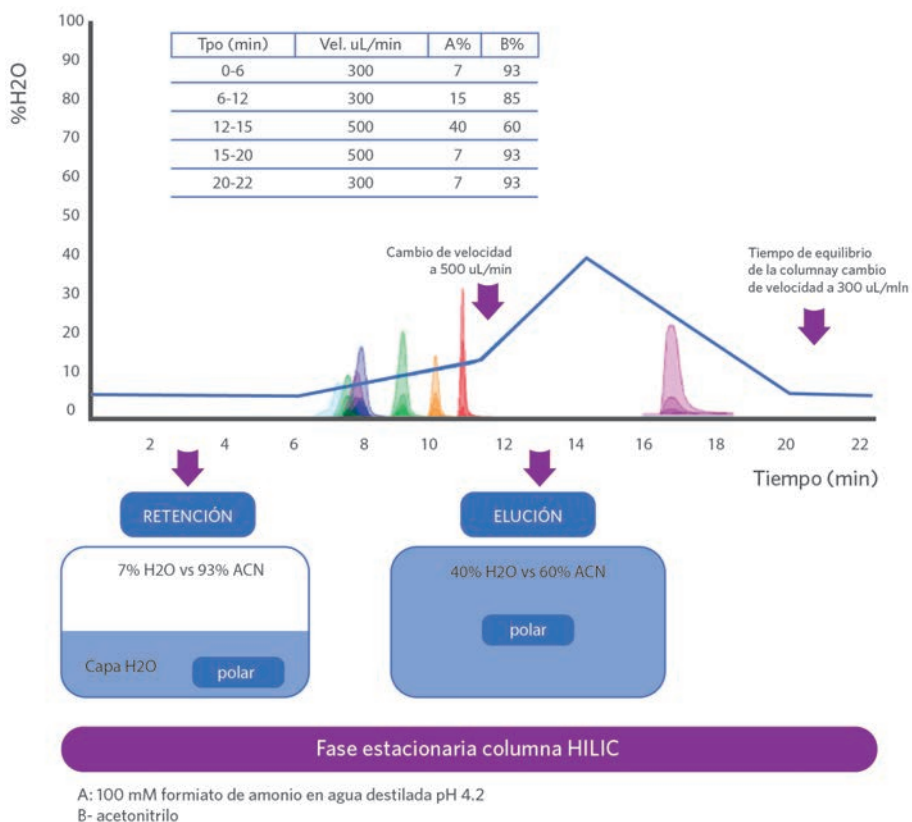


Figura 5-29: Gradiente de solvente empleado en la columna HILIC y la interacción con la columna, en el método de pelo. Poroshell 120 HILIC, 2.1×100 mm, 2.7 µm, (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

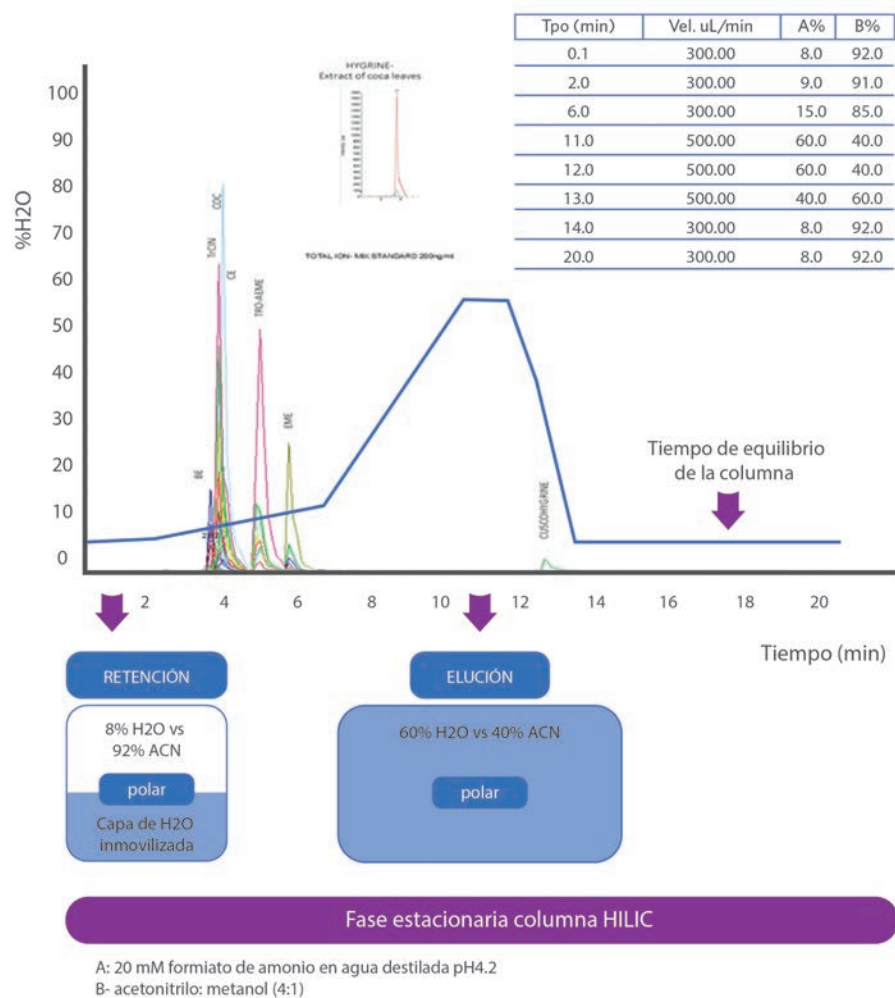


Figura 5-30: Gradiente de solvente empleado en la columna HILIC y la interacción con la columna en el método de fluido oral. LabPoroshell 120 Hilic (2.7 μ m, 2.10 \times 100mm2) from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA).

5.4.4 Efecto Matriz

5.4.4.1 Generalidades

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa empleando fuentes de ionización a presión atmosférica es hoy en día un “Gold standard” en los laboratorios de toxicología forense para el análisis de compuestos farmacéuticos y drogas en matrices biológicas. Se ha observado, en especial cuando se emplea ionización por ESI, alteraciones en las señales en el espectrómetro de masa, que es llamado: “efecto matriz” (EM), que si bien se conocen y han sido extensamente descritas que ocurren no son aún bien entendidas. Las hipótesis sobre los mecanismos que explican la disminución de la señal (signal suppression) son más numerosas que las que tratan de explicar el aumento de la señal (signal enhancement) por EM. (Trufelli H. y col 2011).

Se ha visto que moléculas como las proteínas, lípidos, azúcares o sales afectan el proceso de la ionización y coeluyen con los analitos de la muestra e interfieren en su detección, sea porque disminuyen o aumentan la señal (signal suppression or enhancement). Además de las sustancias endógenas las sustancias exógenas que no están en las muestras, pero pueden provenir de la preparación de la muestra, como productos liberados durante la extracción en fase sólida (SPE), plásticos residuos de polímeros o de los agregados a la fase móvil como por ejemplo tampones, productos liberados de las fases estacionarias de las columnas etc.

La adición de aditivos a la fase móvil como ácido trifluoroacético (TFA), ácido fórmico, ácido acético, hidróxido de amonio, acetato de amonio y formiato de amonio es un parámetro a optimizar, porque son causantes de supresión de la señal, por ejemplo la adición de tampones tales como acetato de amonio y formiato de amonio a la fase móvil puede resultar en un efecto de supresión de la señal, que es mayor al aumentar la concentración del tampón de una concentración de 1 y 5 mM. (Furey A. y col. 2013)

Los métodos de preparación de muestras como extracción por solventes, precipitación de proteínas, extracción por fase estacionario (SPE) o dilución remueven buena parte de estos interferentes endógenos, pero

no totalmente (Marchi, I. col 2010). La precipitación de proteína con solvente orgánico (acetonitrilo) ha demostrado tener mayor efecto matriz que la extracción por fase estacionario (SPE) y la extracción líquido-líquido.

El efecto matriz puede ocurrir durante la preparación de la muestra y/o análisis. El mejoramiento en los procesos de extracción o el uso de analitos deuterados son procedimientos recomendados para disminuir el efecto matriz. Por ejemplo, los extractos obtenidos de columnas de SPE con fase estacionario polimérica o fase sílica intercambiadora de cationes contiene solo 14% del nivel de fosfolípidos de los extractos por precipitación de proteínas. (Ismaiel, O.A. y col 2010).

Es claro que el EM puede variar entre diferentes muestras biológicas, pero lo que no es tan claro que también puede variar en el mismo tipo de nuestros pero pertenecientes a diferentes individuos por ejemplo fluido oral.

5.4.4.2 Medición del efecto matriz.

Dos son los métodos para evaluar el efecto matriz: (ANSI/ASB Standard 036, 1st Ed. 2019)

Infusión post-columna:

Este método de evaluar cualitativamente el efecto matriz nos da información sobre el tiempo de retención donde puede ocurrir una señal de supresión o de aumento, es un método útil en la fase de puesta a punto de los métodos por LCMSMS.

Un flujo constante del analito a investigar es introducido en el eluyente del cromatógrafo líquido después de la columna y antes del espectrómetro de masa. Una muestra de matriz blanco es inyectada en las condiciones cromatográficas del método empleado y se registra la respuesta del analito infundido. Si algún componente endógeno de la matriz que eluye de la columna produce un efecto matriz podrá ser visto como un aumento o una supresión de la señal del analito infundido en regiones específicas del cromatograma.

La adición post-extracción:

Este método de medir el efecto matriz produce una estimación cuan-

titativa de la supresión o el aumento de la señal en los métodos en los que se emplea LCMSMS. Fue el método empleado en nuestros ensayos para determinar el efecto matriz en el fluido oral, pelo y orina cuando se usó LCMSMS y LC-QTOF-MS.

Se prepararon dos conjuntos de muestras una de patrones puros y otra de muestras blanco (fluido oral, pelo, orina etc.) a las que se le adiciona pos-extracción el patrón. Las áreas del analito/s de los patrones puros se compararán con las áreas de los analitos en las muestras de matriz fortificadas con patrones puros después de la extracción o el procesamiento.

El conjunto o SET 1 consiste en estándares limpios preparados en dos concentraciones: una baja y otra alta. Cada uno de estos estándares limpios se inyectará un mínimo de seis veces para establecer un área de pico promedio para cada concentración.

El conjunto o SET 2 debe consistir en un mínimo de diez fuentes de matriz diferentes (por tipo de matriz). Cada fuente de matriz se extraerá por duplicado. Una vez completada la extracción, cada muestra de matriz se reconstituirá / fortificará con el estándar puro de baja o alta concentración. El área media de cada concentración (baja y alta) se empleará para establecer el efecto matriz por supresión o aumento.

$$\text{Ionization suppression or enhancement (\%)} = \left(\frac{\bar{X}_{\text{Area of Set 2}}}{\bar{X}_{\text{Area of Set 1}}} - 1 \right) \times 100$$

Se establece el efecto matriz a dos concentraciones una baja y otra alta.

5.4.4.3 Efecto matriz en los métodos empleados.

Tres tipos de matrices fueron analizadas en nuestros ensayos por LCMSMS: fluido oral, pelo y orina. Como se observa en la **Tabla 5.13** importante efecto matriz por supresión se observa en el método empleado para analizar fluido oral y pelo en todos los analitos con excepción de la cuscohigrina que tiene un efecto matriz de aumento (signal enhancement). No se midió el efecto matriz de la higrina porque no se dispuso del testigo.

Como vimos anteriormente el tipo de matriz y el método de extracción son importantes al evaluar el posible efecto matriz de una muestra. El pelo es el que tiene mayor porcentaje de compuestos orgánicos: 65 a 95% de proteínas, 1 a 9% de lípidos, 0,1 a 5% de pigmentos (melanina), a diferencia del fluido oral y la orina que están constituidas principalmente por agua. Además, el líquido de extracción del pelo contiene formiato de amonio (2mM) al igual que la fase móvil a una concentración de 100 mM, que compiten con el analito en la ionización y disminuyen su señal.

En el fluido oral (mayoritariamente es agua), se empleó para su preparación la precipitación por proteínas con acetonitrilo que no resulta ser un clean-up tan eficiente como la extracción líquido-líquido con metilterbutil-éter empleada en la preparación de las muestras de orina, pudiendo ser una de las causas del menor efecto matriz hallado en la orina. Además, la mayor concentración de los analitos investigados en la muestra de orina en relación a su concentración en el fluido oral o pelo hace que el efecto matriz por supresión sea menor. Furley, A y col (2013) mencionan que el efecto matriz por supresión se ve favorecido cuando el analito se halla en concentraciones traza.

En general los compuestos que coeluyen con la muestra que afectan la señal los hacen al inicio del cromatograma lo que podría ser una de las causas que la cuscohigrina que sale con un tiempo de retención de 12 o 17 minutos no se vea afectada por el efecto supresión y por el contrario tenga un aumento de la señal en las tres matrices. Los lípidos son considerados uno de los componentes más importantes en producir *signal suppression* (Chambers E. y col 2006) y es esperable en una columna HILIC que salgan en los primeros minutos de corrida cuando la proporción de solvente orgánico (ACN) es mayor, conjuntamente con la cocaína, cinamoilcocaína, benzoilcocaína, cocaetileno, metilecgonina, tropococaína y AEME. (**Figuras 5.29 y 5.30**).

Otro factor a considerar es el gradiente y la composición de la fase móvil empleada en el análisis de las muestras de fluido oral, que causa que los cromatogramas tengan menor resolución que los cromatogramas de las muestras de pelo, la menor resolución hace que los analitos sean

más susceptibles a sufrir una disminución de la señal (Chambers E. y col 2006).

	FO*	Pelo*	Orina*
	EM(%)		
Benzoilecgonina	-34	-45	<20%
Cocaetileno	-53	-48	<10%
Cocaína	-61	-31	<10%
Metilecgonina	-67	-29	<20%
Cinamoilcocaína	-74	-49	<15%
Tropococaína	-59	-48	-
Cuscohigrina	+13	+19	+25
AEME	-59	-	-
Norcocaína	-	-17	-

AEME: Anhidroecgonina metil ester

FO: Fluido oral

* Promedio a dos concentraciones (alta y baja)

Tabla 5-13: Efecto matriz en las muestras de FO, pelo y orina analizadas en un LCMSMS.



ANEXO 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO DE ACUERDO CON REQUERIMIENTOS DE LA DIRECCIÓN NACIONAL DE PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES (DNPd) – ARTS. 5° y 6° DE LA LEY 25.326.

INTRODUCCIÓN

Usted está siendo invitada/o a participar en un estudio para investigar “Cómo diferenciar mascadores de hojas de coca de consumidores de cocaína”. El estudio se realizará en (completar lugar/institución). Por favor, lea atentamente este formulario y aclare con el coordinador de la investigación cualquier pregunta que tenga sobre el estudio antes de la firma de este consentimiento.

PROCEDIMIENTO

Si Ud. Está de acuerdo en participar en este estudio:

1. Se le solicitará responder una encuesta
2. Se le solicitará una muestra de orina
3. Le pediremos su permiso para recoger la información de su historia clínica

CUESTIONARIO

Un entrevistador le hará unas preguntas durante una entrevista a realizarse en fecha y horario a convenir. La entrevista dura aproximadamente (completar) y consta de preguntas relacionadas con los hábitos, estilo de vida, el medio ambiente y la salud.

EXTRACCION DE ORINA Y MUESTRA DE CABELLO

Se le solicitará donar una muestra de ORINA en su domicilio y en forma privada. Se le proporcionará para esto un frasco estéril de 100 ml. También se le requerirá que proporcione una muestra de cabello que será tomada por nuestro representante.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

La orina se enviará a laboratorios para su análisis. Sus muestras se

almacenarán para ser utilizadas en los análisis planteados en este estudio. Si Ud. acepta ser parte del mismo, las muestras serán guardadas durante un máximo de (XX) años, para poder hacer en el futuro nuevos análisis, siempre relacionados con el objeto del presente estudio.

INFORMACIÓN: COSTO E INDEMNIZACIÓN

Las muestras obtenidas se utilizarán únicamente para fines de investigación. No habrá ningún costo financiero para que Ud. participe en este estudio y no habrá compensación o pago alguno por completar un cuestionario y proporcionar las muestras.

POSIBLES RIESGOS Y MOLESTIAS

La extracción de muestras no implicará ningún riesgo físico ni molestia alguna.

POSIBLES BENEFICIOS

No habrá beneficios directos para Ud., excepto la satisfacción de participar en esta investigación para el posible beneficio de las generaciones futuras, a través de la mejora de las técnicas médicas. Su participación es muy importante para el éxito de la investigación científica.

GARANTÍA DE CONFIDENCIALIDAD

Su nombre no será utilizado en ningún informe, ni divulgado en forma alguna.

Sus datos no van a ser revelados porque se resguardarán y mantendrán en anonimato en todo momento, cumpliendo con los requerimientos del Art. 2 de la ley N°25.326, con un código que sólo conoce el investigador principal y que no será proporcionado a otras personas, a fin de que no se vincule este código con sus datos personales. Ud. puede solicitar retirar sus datos de la base de datos que guarda el investigador principal en cualquier momento. En cumplimiento de la Disposición N° 10/08 de la DNPDP, le hacemos saber que: “El titular de los datos personales tiene la facultad de ejercer el derecho de acceso a los mismos en forma gratuita a intervalos no inferiores a seis (6) meses, salvo que se

acredite un interés legítimo al efecto conforme lo establecido en el Art. 14, inc. 3 de la Ley N° 25.326” y que la “DIRECCIÓN NACIONAL DE PROTECCIÓN DE DATOS PERSONALES, Órgano de Control de la Ley N° 25.326, tiene la atribución de atender las denuncias y reclamos que se interpongan con relación al incumplimiento de las normas sobre protección de datos personales.”

DERECHO A RETIRARSE DEL ESTUDIO

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Usted puede negarse a participar, o retirarse del mismo en cualquier momento, sin que ello le genere perjuicio alguno. Si en la etapa inicial Ud. decide dar su consentimiento para el almacenamiento de muestras para la investigación futura, pero luego cambia de parecer, puede efectuar la solicitud de retiro de sus muestras al investigador principal.

CERTIFICACIÓN

He leído la explicación sobre el estudio, he tenido la oportunidad de realizar consultas y aclarar mis dudas. Al aceptar participar en este estudio no renuncio a ningún derecho. Estoy de acuerdo en participar en las partes del estudio que están marcadas con un “sí” y me niego a participar en las partes del estudio que están marcadas con un “no”. He recibido una copia de este consentimiento.

SI NO PARTE DEL ESTUDIO

☐ ☐ Entrevista
☐ ☐ Muestra de orina
☐ ☐ Muestra de cabello
☐ ☐ Acepto que mis muestras sean almacenadas por un plazo de hasta XX años.

Por medio de la presente y en mi carácter de **TITULAR DE LOS DATOS** (en caso de ser menor de edad, insertar datos de padre, madre o tutor conjuntamente con los del titular), presto mi **CONSENTIMIENTO** para que (nombre de la entidad investigadora) efectúe el tratamien-

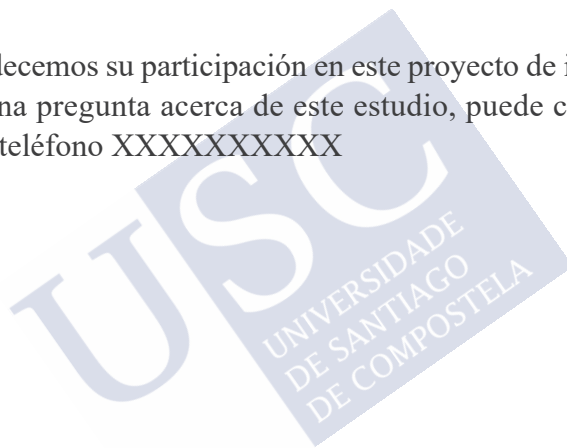
to de mis datos personales, conforme a las especificaciones establecidas en el presente documento.

Firmado en, a los días del mes de de 20.....

FIRMA DEL TITULAR DE LOS DATOS
NOMBRE Y APELLIDO COMPLETOS

FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL
NOMBRE Y APELLIDO COMPLETOS

Agradecemos su participación en este proyecto de investigación. Si tiene alguna pregunta acerca de este estudio, puede comunicarse con XXXX al teléfono XXXXXXXXXX





ENCUESTA

Identificación:

Edad:

Sexo:

Ocupación:

Sustancia/s que consume:

Forma de consumo (esnifada, inyectada, fumada, mascada otras):
(detalle de las muestras que consume: forma, envoltorios, aspecto, olor etc).

Cantidad (miligramos u otra medida) **por vez de consumo:**

Frecuencia de consumo (veces por día, semana o mes):

Tiempo de consumo (semanas, meses, años):

Medicación que toma:

Enfermedades que padece:

Ultimo consumo al momento de la toma de muestra (horas, días):

Fumador:

Muestra que se extrae: SI NO

ORINA

PELO

Observaciones:

Referencias

1. Agilent Technologies, Inc. 2011. Time-of-Flight Mass Spectrometry. Overview. 5990-9207ES.octubre 13 _2011.
2. Agilent Technologies, Inc. 2010. Guía de selección de columnas Agilent J&W para GC. 5990-5488ES.
3. Alpert, A.J. Hydrophilic-Interaction Chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography*, 499 (1990) 177-196.
4. Amezqueta, S.; Subirats, X.; Fuguet, E.; Roses, M.; C. Rafols, C. Octanol-Water Partition Constant. Chapter 6. Liquid-Phase Extraction. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00006-2>.
5. Aps, J.K.M.; Martens, L.C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Science International* 150 (2005) 119–131.
6. Balcells, G., Pozo, O. J., & Ventura, R. (2016). High-Resolution Mass Spectrometry in Doping Control. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 91–117. doi: 10.1016/bs.coac.2016.01.009 -Chapter 4.
7. Belmonte, E.; Ortega, M.; Arevalo, P.; Cassman, V.; Cartmell, L. (2001). Presencia de la hoja de coca en el ajuar funerario de tres cementerios del periodo Tiwanaku: AZ-140, Az,6 y PLM-31. *Chungará (Arica)* 33 (1): 125-135.
8. Boudreau, D.K.; Casale, J.F. An In-Depth Study of the Peruvian Base Llavada (“Washed Base”) Technique for Purification of Crude Cocaine Base. *Microgram Journal*, Volume 6, Numbers 3-4 (July - December, 2008).
9. Broecker, S.; Herre, S.; Wüst, B.; Zweigenbaum, J.; Pragst, F. Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC-QTOF-MS with data-dependent acquisition. *Anal Bioanal Chem* 117 (2011) 400:101. DOI 10.1007/s00216-010-4450-9.
10. Broecker, S.; Herre, S.; Pragst, F. General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Science International* 218 (2012) 68–81.
11. Buszewski B.; Noga, S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. Review. *Anal Bioanal Chem* (2012) 402:231–247 DOI 10.1007/s00216-011-5308-5.
12. Casale, J.F.; Klein, R.F.X. Illicit Production of Cocaine. *Forensic Sci. Rev.*

1993, 5, 95.

13. Cavazzini, A.; Catani, M.; Felinger, A. Hydrophilic interaction liquid Chromatography. Chapter 6. Liquid Chromatography. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00006-3>. 2017. Elsevier INC.

14. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Pharmaceutical Press. Third edition. 2004.

15. Cooper, G.A.A.; Kronstrand R.; Kintz, P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. Forensic Science International 218 (2012) 20–24.

16. Chambers, E.; Wagrowski-Diehl, D.M.; Lu, Z.; Mazzeo, J.R. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. Journal of Chromatography B, 852 (2007) 22–34.

17. Choo R.E.; Huestis, M.A. Oral fluid as a diagnostic tool. Clin Chem Lab Med 2004;42(11):1273–1287.

18. Drager, B. Analysis of tropane and related alkaloids- Review. Journal of Chromatography A, 978 (2002) 1–35.

19. DrugBank Version 5.0. <<https://www.drugbank.ca/drugs>>. Accedio marzo 2020.

20. El-Aneed, A.; Cohen, A.; Banoub, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. Commonly Used Mass Analyzers, Applied Spectroscopy Reviews, 44:3, (2009) 210-230, DOI: 10.1080/05704920902717872

21. Fernández-Peralbo, M.A.; Luque de Castro, M.D. Preparation of urine samples prior to targeted or untargeted metabolomics mass-spectrometry análisis. Trends in Analytical Chemistry, 2012; 41:75-85.

22. Fletcher, S. M.; Hancock, V. S. Potential errors in benzoylecgonine and cocaine analysis, Journal of Chromatography 1981, vol. 206, pp. 193–195.

23. Fontanals, N.; Marcé, R.M.; Borrull, F. Tendencias en sorbentes poliméricos para la extracción en fase sólida de compuestos polares. CROMATOGRFÍA Y TÉCNICAS AFINES Madrid, junio de 2010 Vol. 31, núm. 1- ISSN 1132-1369.

24. Furey, A.; Moriarty, M.; Bane, V.; Brian Kinsella, B.; Lehane, M. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. Talanta 115(2013)104–122.

25. Giroud, Ch.; Michaud, K.; Sporkert, F.; Eap, Ch.; Augsburger M.; Cardinal, P.; Mangin, P. A Fatal Overdose of Cocaine Associated with Coingestion of Marijuana,

Buprenorphine, and Fluoxetine. Body Fluid and Tissue Distribution of Cocaine and Its Metabolites Determined by Hydrophilic Interaction Chromatography-Mass Spectrometry (HILIC-MS) *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 28, September 2004.

26. Ismaïela, O.A.; Zhang, T.; Jenkins, R.G.; H. Thomas Karnes, T. Investigation of endogenous blood plasma phospholipids, cholesterol and glycerides that contribute to matrix effects in bioanalysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 3303–3316.

27. Kintz P. (editor) *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*. CRC press 2007. https://books.google.com.ar/books?id=IBBq180lUEAC&pg=PA28&lpg=PA28&dq=Incorporation++of+drugs+in+hair&source=bl&ots=bm55v1_wGA&sig=ACfU3U2cnFGUhnfmD30Yuxtfh8c4Uc_mk-g&hl=es419&sa=X&ved=2ahUKEwiDzrXI277oAhUJCrk-GHUjHApEQ6AEwEnoECAoQAQ#v=onepage&q=Incorporation%20%20of%20drugs%20in%20hair&f=false (marzo 2020).

28. Kintz, P.; Spiehl, V.; Negrusz, A; Cooper G.A.A. Alternative specimens. Chapter 6. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. 2013. Second edition. Pharmaceutical Press.

29. Kiszka, M.; Buszewicz, G.; Mýdro, R. Stability of cocaine in phosphate buffer and in urine. *Z Zagadnień Nauk S'lowych*, z. XLIV, 2000, 7–23.

30. Letzel, T. Specifications of Gradients in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC). Chapter 6. *Gradient HPLC for Practitioners*, First Edition. Edited by S. Kromidas. ©2019 Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

31. Lünig B.; Leander K. Studies on Orchidaceae Alkaloids III. *Acta Chemica Scandinavica* 19 (1965) 1607-1611.

32. Machado Carzola, E. (1972). El género *Erythroxylum* en el Perú. *Raymon-diana* 5: 13-23.

33. Madry, M.M.; Kraemer, T.; Baumgartner, M.R. Systematic assessment of different solvents for the extraction of drugs of abuse and pharmaceuticals from an authentic hair pool. *Analytica Chimica Acta* Volume 857, 1 February 2015, Pages 1-27.

34. Marchi, I.; Viette, V.; Badoud, F.; Fathi, M.; Saugy, M.; Rudaz, S.; Veuthey, J-L. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses. *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 4071–4078.

35. McCalley, D.V. Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of

ionisable compounds? *Journal of Chromatography A*, 1171 (2007) 46–55

36. Moldoveanu, S.; David, V. Phase Transfer in Sample Preparation. Chapter 5. In *Modern Sample Preparation for Chromatography* <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-54319-6.00005-0>, 2015.

38. Naidong, W. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases. *Journal of Chromatography B*, 796 (2003) 209–224.

39. Nawrocki, J. The silanol group and its role in liquid chromatography. Review *Journal of Chromatography A*, 779 (1997) 29–71.

40. Nielsen, M.K.; Johansen, S.S.; Dalsgaard, P.W.; Linnet, K. Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC–TOF–MS. *Forensic Science International* 196 (2010) 85–92.

41. Niu, Z.; Zhang, W.; Yu, Ch.; Zhang, J.; Wen, Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques *Trends in Analytical Chemistry* 102 (2018) 123e14.

42. OSACA. Standard for Identification Criteria in Forensic Toxicology Foreword. 2018

43. Polson, C.; Sarkar, P.; Incledon, B.; Raguvaran, V.; Grant, R. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry *J. Chromatogr. B* 785 (2003) 263–275.

44. Pragst, F.; Balikova, M.A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta* 370 (2006) 17–49.

45. PubChem. U.S. National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/tert-Butyl_methyl_ether (consultado marzo 2020).

46. Rai, B. Oral Fluid in Toxicology. *The Internet Journal of Toxicology*. 2006 Volume 3 Number 2.

47. Rockwood, A.L.; Kushnir, M.M.; Clarke, N.J. Mass Spectrometry. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5> (2018).

48. Rodríguez-Gonzalo, E; García-Gómez, D. Hydrophilic Interaction Chromatography: Current Trends and Applications. Chapter · January 2018 DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.12681-2. 2018 Elsevier Inc

49. Rury, P. M. and Plowman, T. (1983). Morphological studies of archeological and recent coca leaves (*Erythroxylum* spp.). Botanical Museum leaflets, Harvard University 29 (4): 297-391.

50. Rury, Phillips M. (1981) Systematic anatomy of *Erythroxylum* P. Brownw: Practical and Evolutinary implications for the cultivated cocas. Journal of Ethnopharmacology, 3 (2-3): 229-263.

51. Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. ANSI/ASB Standard 036, 1st Ed. 2019.

52. Trufelli, H.; Palma, P.; Famiglini, G.; Cappiello, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. Mass Spectrometry Reviews, 2011, 30, 491– 509.

53. Singh Mamta, Singhal Udit, Bhasin GK, Panday Rajesh, Aggarwal SK. Oral fluid: Biochemical composition and functions: A review. Journal of pharmaceutical and biomedical sciences (J Pharm Biomed Sci.) 2013 December 37(37): 1932-1941.

54. TIAFT – The International Association of Forensic Toxicologists Committee of Systematic Toxicological Analysis. Recommendations on Sample Preparation of TIAFT TIAFT -Biological Specimens for Systematic Toxicological Analysis. TIAFT-Bulletin XLI - Number 2.

55. Tillman, W.J.; Higuchi T. Quantitative evaluation of the interaction of callus strips with some hydroxylic solvents. Journal of Investigative Dermatology Volume 37, Issue 2, August 1961, Pages 87-92.

56. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials. UNODC, Vienna 2012.

57. Vogliardi, S.; Tucci, M.; Stocchero, G.; Santo Davide Ferrara, S.; Favretto, D. Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review. Analytica Chimica Acta. Volume 857, 1 February 2015, Pages 1-2





IV-RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS TRABAJOS PRESENTADOS

Capítulo 6





6.

TRABAJOS PRESENTADOS- DISCUSIÓN

“Solo existen dos días en el año en el que no se puede hacer nada uno se llama ayer y otro mañana.”

Dalí Lama.

6.1 INTRODUCCIÓN.

En este capítulo haremos una discusión sobre los trabajos presentados y los resultados hallados. La presentación de los paperes y los pósteres no se hará en orden cronológico de su ejecución, sino siguiendo una cierta relación para comprensión del lector de este capítulo.

En el *Capítulo 5* discutimos y presentamos los puntos analíticos considerados más importantes que nos llevaron a proponer a dos alcaloides derivados de la pirrolidina y constituyentes de la hoja de coca (**Foto 6-1**) como marcadores de consumo de las mismas, ya sea a través del mascado o de la ingesta de té de coca.



Foto 6-1: Hojas de coca.

En este capítulo se detallarán los paperes y presentaciones a congreso a través de pósteres que nos llevaron a concluir que la **HIGRI-NA** ((1-methylpyrrolidin-2yl)-propan-2-one) y **CUSCOHIGRINA** ((1,3-bis-(1-methylpyrrolidin-2yl)-propan-2-one) (**Figura 6-1**) pueden ser empleados en la práctica para determinar en un individuo si es mascador o bebedor de té de co-

ca a través del análisis de su **ORINA, FLUIDO ORAL Y PELO**, con sus limitaciones, que serán propuestas para futuras investigaciones. Al-

gunas de las propuestas y dudas que se fueron presentando a lo largo de los estudios fueron también resueltas y se irán actualizando.

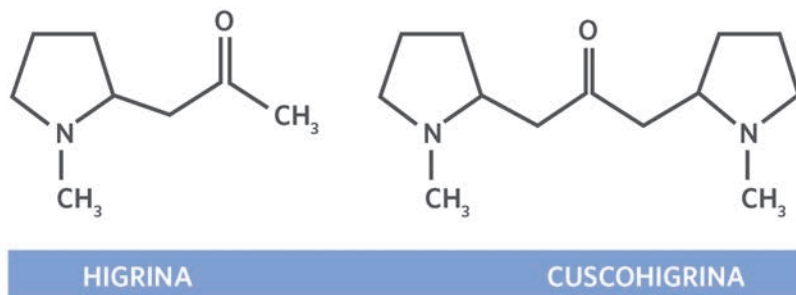


Figura 6-1: Marcadores de consumo de hojas de coca.

6.2 ORDEN DE PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS.

Para su mejor entendimiento los trabajos serán divididos en cinco grupos: A, B, C, D y E, se agrupan por temas según la matriz analizada como se muestra en la **Tabla 6-1**. En la **Tabla 5-1** del **Capítulo 5** se detallan en cada trabajo las muestras y los compuestos analizados, es complementaria de la **Tabla 6-1**.

GRUPO A	
PRODUCCION ILEGAL DE COCAINA	
Paper	Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse. Rubio N.C.; Krumbiegel F.; Thrmann D.; Pragst F. Drug Test. Analysis (2016)
Póster	La eliminación de la higrina y cuscohigrina en las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascaradores de hoja de coca de consumidores de cocaína. Rubio, N.C.; Marquez, C.; Confalonieri, A.; Castiglione, J. TIAFT- PERU- (noviembre 2015)
Póster	Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse. Rubio N.C.; Krumbiegel F.; Thurmman D.; Pragst F. TIAFT- Firenze- (2015)
GRUPO B	
ORINA	
Paper	Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. Rubio, N.C.; Strano-Rossi, S.; Tabernero-Duque, M.J.; González, J.L.; Anzillotti, L.; Chiarotti, M.; Bermejo, A.M. Forensic Science International 227 (2013) 60-63
Paper	Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. Rubio, N.C.; Strano-Rossi, S.; Tabernero-Duque, M.J.; González, J.L.; Anzillotti, L.; Chiarotti, M.; Bermejo, A.M. Forensic Science International 243 (2014) 30-34
Paper	The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years. N.C. Rubio; A. Moreda-Piñeiro; I. Álvarez-Freire; P. Bermejo-Barrera; M.J. Tabernero-Duque; A.M. Bermejo. Microchemical Journal 151 (2019) 104215
Póster	Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. Rubio, N.C.; Strano-Rossi, S.; Tabernero-Duque, M.J.; González, J.L.; Anzillotti, L.; Chiarotti, M.; Bermejo, A.M. TIAFT-Japón (2012)
Póster ★ (1er premio mejor póster)	Determinación en orina por UHPLC-MS/MS de dos nuevos mascaradores para diferenciar el mascarador de hoja de coca del consumidor de cocaína. Rubio, N.C.; Strano-Rossi, S.; Tabernero-Duque, M.J.; González, J.L.; Anzillotti, L.; Chiarotti, M.; Bermejo, A.M. TIAFT- 9 no Congreso Regional Latinoamericano - 4 al 8 de noviembre de 2013- Uruguay-
Póster	Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases Rubio, N.C.; Strano-Rossi, S.; Tabernero-Duque, M.J.; González, J.L.; Anzillotti, L.; Chiarotti, M.; Bermejo, A.M. TIAFT-Madeira (2013)
Póster	Detection of coca alkaloids in coca leaves and urine samples to proof the consumption of natural coca products. Franziska Krumbiegel, Eric Zytowski, Sven Hartwig, Cristina Rubio, Fritz Pragst. GTFCh symposium Mosbach-2019
Póster	LCMSMS vs GCMS in the detection of cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in the real urine samples of coca leaves chewers after six years storage. N.C. Rubio; A. Moreda-Piñeiro; I. Álvarez-Freire; P. Bermejo-Barrera; M.J. Tabernero-Duque; A.M. Bermejo. TIAFT- Birminham - septiembre 2019

Tabla 6-1: Trabajos y pósteres agrupados por tema.

PELO	
GRUPO C	<p>Paper Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. Rubio N.C.; Hastedt, M.; González, J.; Pragst.F. Int J Legal Med. (2014) DOI 10.1007/s00414-014-1061-6</p>
	<p>Paper Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco"(coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitation. Rubio N.C.; Krumbiegel F.; Thurmman D.; Nagel A.; Aranguren M.; Gorlero J.C.; Polinsky N.; Pragst F. Forensic Science International 297 (2019) 171-176</p>
	<p>Póster Can the use of alkaline substance during chewing coca leaves change the distribution of alkaloids of cocaine in hair? Rubio N.C.; Hastedt, M.; González, J.; Pragst.F. TIAFT- Buenos Aires-noviembre 2014</p>
	<p>Póster Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco"(coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitation. Rubio N.C.; Krumbiegel F.; Thurmman D.; Nagel A.; Aranguren M.; Gorlero J.C.; Polinsky N.; Pragst F. TIAFT- Boca Raton - enero 2019</p>
FLUIDO ORAL	
GRUPO D	<p>Paper Development of a Reliable Method for Assessing Coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC-MS-MS Rubio N.C.; Moreda Piñeiro A.; Bermejo-Barrera P.; Bermejo A.M. Journal of Analytical Toxicology, 2018;1-7 doi: 10.1093/jat/bky076</p>
	<p>Paper Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar Rubio N.C.; Moreda Piñeiro A.; Bermejo-Barrera P.; Bermejo A.M. Acta Toxicol. Argent. (2019) 27 (2): 72-80</p>
	<p>Póster Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco"(coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitation. Rubio N.C.; Krumbiegel F.; Thurmman D.; Nagel A.; Aranguren M.; Gorlero J.C.; Polinsky N.; Pragst F. TIAFT- Boca Raton - enero 2019</p>
PLASMA	
GRUPO E	<p>Póster Cocaine, benzoylecgonine and cuscohygrine profile in plasma from a volunteer who chews coca leaves. Preliminary study. N.C. Rubio; A. Moreda-Piñeiro; I. Álvarez-Freire; P. Bermejo-Barrera; M.J. Tabernero-Duque; A.M. Bermejo. TIAFT- Birminham - septiembre 2019</p>
	<p>Paper Detection window of cocaine, benzoylecgonine, and cuscohygrine in plasma and urine of a chewer of coca leaves by GCMS and immunoassay COBAS 400- Preliminary results. Rubio N.C.; Moreda-Piñeiro A.; Álvarez-Freire I.; Cabarcos P.; Bermejo-Barrera P.; Tabernero-Duque M.J.; Bermejo A.M. (Para enviar a revisión)</p>

Tabla 6-1: Trabajos y pósteres agrupados por tema (continuación).

Como se hizo mención en el *Capítulo 2 (sección 2.3)*, Argentina es un caso anómalo en el uso de la coca, porque no solo está circunscripto el mascado de hojas de coca a la población autóctona, sino que está arraigado en todas las clases sociales, incluso profesionales y empresarios y también entre sectores pobres. Esta afirmación que hacen Ricardo Abduca y Pien Metaal (2013) y que es una realidad comprobable para quienes vivimos en Argentina queda de manifiesto cuando se observan las profesiones de los voluntarios que participaron en nuestros estudios. Las muestras de orina y pelo obtenidas de la población del noroeste argentino (previo consentimiento informado) pertenecen a un amplio y variado segmento social. **Nos parece interesante antes de realizar un análisis de los resultados de laboratorio volver a remarcar la importancia de hacer un avance en diferenciar desde el laboratorio a quienes hacen un uso legal de la hoja de coca de aquellos consumidores de cocaína, no solo es una problemática local, sino que el hecho de que el té de coca sea un producto comercial, ha llevado esta situación fuera de las fronteras de Latinoamérica.** En los controles de drogas de deportistas o de fuerzas de seguridad o militares, se han dado casos de cocaína positivos quienes alegan no ser por consumo de cocaína sino por ingesta de té de coca, legalmente comercializado y adquirido por turistas de distintas nacionalidades.

6.3 GRUPO A: TRABAJOS QUE MUESTRAN EL DISTINTO COMPORTAMIENTO DE LA HIGRINA Y CUSCOHIGRINA CON RESPECTO A LA COCAÍNA EN EL PROCESO DE OBTENCIÓN ILEGAL DE CLORHIDRATO DE COCAÍNA A PARTIR DE LAS HOJAS DE COCA.

Las características fisicoquímicas distintas de la higrina y cuscohigrina, dos alcaloides derivados de la pirrolidina, en cuanto a su solubilidad, pKa etc. hacen posible que se aislen en los primeros pasos de la producción de la cocaína. En el *Capítulo 5* se explicaron las diferencias entre los distintos alcaloides de las hojas de coca que explican su comportamiento en el proceso de separación de las hojas de coca.

Los procedimientos clandestinos de extracción y purificación de la cocaína ya fueron discutidos en el *Capítulo 4 (sección 4.5)*, pueden existir modificaciones pero básicamente la cocaína es extraída de las hojas de coca previo agregado de una sustancia alcalina o como sal por el empleo de un ácido pero luego debe ser re-extraída para su purificación con un solvente generalmente keroseno o algún otro derivado del petróleo y es en ese paso donde se separa la cocaína de la higrina y cuscohigrina, además de la ecgonina metil éster (EME) que quedarán en la fase acuosa. Esto es lo que hace que la higrina y cuscohigrina sean considerados buenos marcadores para diferenciar el mascarador de hojas de coca del consumidor ilegal.

La ecgonina metil éster (EME) no se consideró como un probable mascarador porque es un producto del metabolismo de la cocaína en el hombre.

La cinamoilcocaína, un alcaloide derivado del tropano como la cocaína y con características fisicoquímicas similares en cuanto log P, pKa etc. acompaña a la cocaína como contaminante en su extracción, por lo que no es un marcador tan específico como la higrina y cuscohigrina. La cinamoilcocaína debe ser eliminada en la producción ilegal por el agregado de oxidantes, pero este paso no es siempre obligatorio en la producción clandestina.

Estos trabajos nos dan el sustento científico para considerar a la higrina y cuscohigrina como marcadores del uso directo de las

hojas de coca (mascado o beber té de coca), dado que no son detectados en los consumidores de cocaína (orina, fluido oral y pelo). La cantidad residual de higrina y cuscohigrina que queda en la etapa de pasta de coca (etapa “D” en las tablas 6-2 y 6-3) con relación a la cocaína es aproximadamente 40.000:1 (Cocaína/cuscohigrina o higrina), lo que justifica por qué ninguno de estos marcadores fuera reportado en los análisis de muestras de secuestro o de alijos. Vestigios de higrina y cuscohigrina serán detectados en el análisis de pelo de algunos consumidores de cocaína, suponiendo tenga que ver la calidad de la droga consumida a lo largo del tiempo.

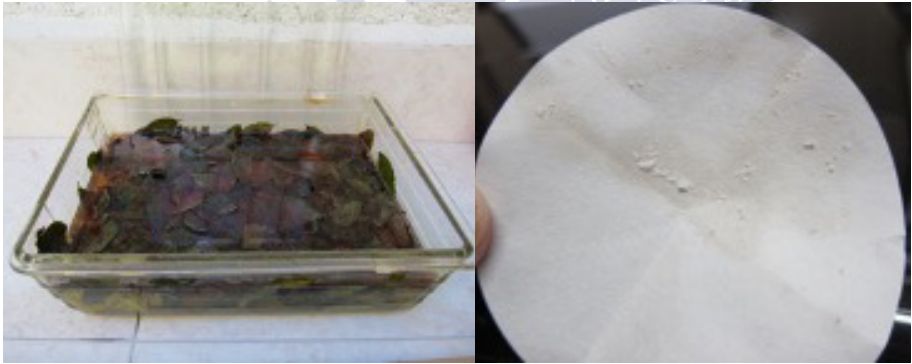
En la publicación Drug Test. Analysis (2016) se planteó la duda sobre si estos resultados serían similares en hojas de coca de otras regiones o países, consideramos que si (cualitativamente), por lo que se explica en el **Capítulo 4**, la síntesis del anillo de la pirrolidina y del tropano provendrían del aminoácido L-ornitina por lo que la higrina y cuscohigrina estarían presente con la cocaína en ambas especies de *Erythroxylum*: coca y novogranatense y sus cuatro variedades: E. coca var. coca (Coca Huánuco o Coca Boliviana), E. coca var. ipadu Plowman (Coca amazónica), E. novogranatense var. novogranatense, E. novogranatense var. truxillense.

Dos tablas para resumir los resultados de dos formas de extracción de cocaína de las hojas de coca, **Tabla 6-2** (extracción por solventes) y **Tabla 6-3** (extracción ácida), cuando se llega al punto de obtener Pasta de Coca prácticamente la higrina y cuscohigrina fueron eliminadas. **Foto 6-2** se muestran dos etapas de la producción de la pasta de coca.

Concentratios of coca alkaloids determined by LC-MS/MS for the coca leaf extraction steps A, B and D							
Step	Description	Concentration, % by weight					
		COC	EME	CIN	TRO	HYG*	CUS
A	Dried fresh coca leaf	0.88	0.97	1.66	0.083	1.1	0.41
B	Extracted coca leaf	0.007	0.05	0.047	0.013	0.77	0.48
C	Coca paste	79.6	3.4	16.8	0.064	0.002	0.002

*Relative concentration of HYG, calculated as the peak area divided by the EME-d3 area and the sample weight

Tabla 6-2: Extracción por solventes de la cocaína.
(Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse.
Drug Test. Analysis (2016))



**Foto 6-2: Extracción de hojas de coca con keroseno (izq.)
y pasta de coca sobre papel de filtro (derecha).**

Extracción ácida (POSTER- TIAFT PERÚ)						
	HIG	EME	CUS	TRO	COC	CIN
A-Extracción ácida de las hojas de coca	0,32	10,67	0,09	0,21	87,82	0,88
B-Fracción kerosene luego de alcalinizar A	0,60	0,03	0,01	0,10	97,67	1,59
C- Deshecho luego de la extracción con keroseno	66,82	13,50	5,43	0,26	13,96	0,02
D-Pasta de coca	0,02	9,92	nd	0,13	89,59	0,34

Porcentaje expresado: (Área del compuesto /sumatoria del área de todos los compuestos) *100
Agilent CG 7890 A triple Quad 7000 A, columna HP-5MS, empleado en modo scan (singleQ) y MSMS modo dMRM.

Tabla 6-3: Extracción ácida de la cocaína.



Short communication

Drug Testing
and Analysis

Received: 2 January 2016

Revised: 18 February 2016

Accepted: 18 February 2016

Published online in Wiley Online Library

(www.drugtestinganalysis.com) DOI 10.1002/dta.1972

Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse

Nelida Cristina Rubio,^a Denise Thurmman,^b Franziska Krumbiegel^b
and Fritz Pragst^{b*}

Hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) are natural alkaloids of coca leaves but are not found in illicit cocaine seizures. Therefore, they were proposed as markers for coca chewing in contrast to cocaine abuse in urine and hair testing. In order to examine at which step of the illegal cocaine production these compounds are lost, coca leaves were processed according to an authentic procedure by extraction with lime and kerosene, re-extraction with sulphuric acid, and precipitation of coca paste with ammonia. Non-extracted and extracted coca leaves, acidic extract and coca paste were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for cocaine, ecgonine methyl ester (EME), cinnamoyl ecgonine (CIN), HYG, and CUS. It follows from the results that under these conditions, HYG and CUS are extracted only to a minor extent by kerosene and are not precipitated from the acidic re-extract in the coca paste. Due to this behaviour in illegal cocaine production, they fulfil the conditions as markers for coca chewing in an optimal way. However, for unambiguous discrimination between coca chewing and cocaine abuse in human samples, additional markers of manufactured cocaine are required. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: coca chewing; cuscohygrine; hygrine; illegal cocaine production; markers

Introduction

In contrast to the illegal use of any form of manufactured cocaine, chewing of coca leaves is used traditionally in several countries in South America such as Bolivia, Perú, Chile, and Argentina. For instance, in Argentina, a Federal Law allows the coca-chewing habit.^[1] This habit is common and socially integrated. It is not restricted to the indigenous population but is used in all layers of citizen and in all professions. Thus, the different legal status of chewing coca leaves and consuming cocaine requires diagnostic methods to discriminate between both manners of use.

It was shown in a previous study that there are two suitable markers for coca chewing. The pyrrolidine alkaloids hygrine and cuscohygrine (Figure 1) are present in coca leaves^[2–5] and in urine from coca chewers but were neither detected in seized illicit cocaine nor in urine samples from consumers of cocaine (detection limit of 100 ng/mL).^[5,6] Hygrine and cuscohygrine were also shown to be suitable markers of coca chewing and for discrimination from use of manufactured cocaine in combination with some further criteria in hair analysis.^[7]

Both alkaloids have not been described by other authors in any of the numerous reports about the composition of seized cocaine samples.^[8–13] The absence of hygrine and cuscohygrine in street cocaine seizures can be explained by their loss during the illegal procedures of extraction and purification of cocaine from the leaves.

The illicit production of natural cocaine from coca leaf was reviewed by Casale and Klein in 1993.^[14] This work is also referred to in the United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC)

recommended methods for the identification and analysis of cocaine in seized materials from 2012.^[15] There are no recent comprehensive publications about this topic in the scientific literature. However, it can be seen from actual publications on the Internet^[16] and YouTube videos that the basic principles and procedures are still the same. These include production of coca paste from coca leaf via both solvent and acid extraction techniques, purification of coca paste to cocaine base, and conversion of cocaine base to cocaine hydrochloride.

In this study, we investigated at which step hygrine and cuscohygrine are lost in the most frequently used solvent extraction technique for illicit production of coca paste.

Materials and methods

Coca leaves

The coca leaves were legally purchased from peddlers in the north of Argentina.

* Correspondence to: Fritz Pragst, Institute of Legal Medicine, University Medicine Charité, Humboldtstrasse 21, Building N, 10559 Berlin, Germany. E-mail: fritz.pragst@charite.de

^a Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Patagonia, Argentina

^b Institute of Legal Medicine, University Medicine Charité, Berlin, Germany

Drug Testing and Analysis

N. C. Rubio, D. Thurmann, F. Krumbiegel and F. Pragst

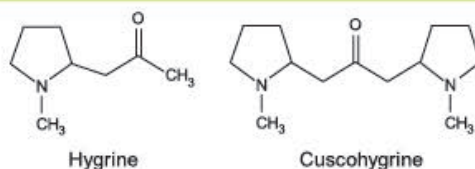


Figure 1. Structure of hygrine and cuscohygrine.

Chemicals and reagents

Lime [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] was obtained from a building supplies store and kerosene from a gas station in Argentina. Sulphuric acid and ammonia (25%) were purchased from Merck-Argentina. The reagents, reference substances and deuterated standards of cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME), cinnamoylcocaine (CIN), cuscohygrine (CUS), and tropacocaine (TRO) used for gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis were described in previous papers.^[5-7] Hygrine (HYG) was not available as a standard compound and was identified by authentic mass spectra.^[5,7]

Extraction of coca leaves

The solvent extraction was performed as described by Casale and Klein and in the UNODC document.^[14,15] The flow chart of the experiment is shown in Figure 2. Both large and small coca leaves were extracted. The first are the most common coca leaves used in Argentina. The extractions were carried out in duplicate. Five grams of fresh and dried coca leaves (A) were crushed, mixed with 10 mL of water, 1 g of lime and 50 mL of kerosene and stirred for 2 h. Then, the kerosene was separated from the extracted coca leaves (B) and back-extracted with 2 mL of diluted sulphuric acid

(1% in water). At this point, the kerosene was discarded and the aqueous layer (C) was made alkaline with a few drops of 25% ammonia, which resulted in precipitation of crude cocaine together with other alkaloids. The product was filtered off and dried to give coca paste (D).

Qualitative analysis by GC-MS

The qualitative analysis by G-MS was performed as described previously.^[5] Aliquot of the non-extracted coca leaves (A) were made alkaline by carbonate/bicarbonate buffer (pH 9) in distilled water in the same way as previously described and extracted with tert-butyl methyl ether (TBME). The extracted coca leaf (B) was extracted with TBME without addition of further reagents. The addic aqueous layer (C) was made alkaline with ammonia before extraction with TBME. The organic layer was evaporated under a gentle nitrogen stream and reconstituted in methanol. The coca paste D was dissolved in methanol at a concentration of 0.1 mg/mL. One μL of the methanol solutions were injected onto the GC-MS.

GC-MS analyses were performed by a Hewlett-Packard 6890A GC coupled with an Agilent 5973N mass selective detector (Agilent, Little Falls, USA). The GC was equipped with a 5% phenylmethylsilicone capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 mm film thickness, Agilent, Little Falls, USA). The GC injection port was set at 250 °C in splitless mode; helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The oven temperature was held at 70 °C for 3 min, increased by 25 °C/min to 270 °C and held there for 3 min.

Quantitative analysis by LC-MS/MS

The LC-MS/MS analysis was performed as described in detail in a previous paper.^[7] Aliquots of non-extracted and extracted coca leaves A and B were cut into small pieces and 10 mg were incubated with 1 mL of a mixture of methanol/acetonitrile/2 mM ammonium formate (25:25:50, v/v/v) for 24 h. After centrifugation, the liquid was separated, purified by microfiltration and 1:100 diluted with the same solvent. From the coca paste D, 1.9 mg was dissolved in 5 mL of the same solvent and 1:100 diluted. A mixture of deuterated standards (5 μL of each 1 ng/ μL cocaine-d₃, benzoylecgonine-d₃, and ecgonine methyl ester-d₃) was added to 0.5 mL of the diluted solution. From this, 2 μL were injected for LC-MS/MS measurement.

An HPLC device Agilent 1200SL consisting of a degasser, an HPLC autosampler, a binary pump Bin Pump SL and a TCC SL column oven (40 °C) with a Poroshell 120 HILIC column (2.1 \times 100 mm, 2.7 μm) was applied for chromatographic separation under the following conditions: mobile phase A ammonium formate buffer pH 4.2, mobile phase B acetonitrile, and gradient A/B 7:93 with a

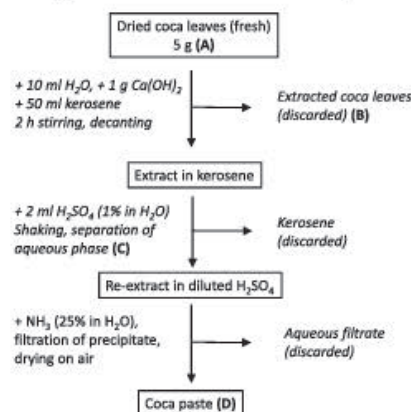


Figure 2. Flow chart of coca leaf extraction in the present study.

Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production

flow of 0.300 mL/min for 6 min, changing to 15.85 in 6 min, changing to 40.60 in 3 min, increasing the flow to 0.500 mL/min and holding for 20 min for column conditioning, then return to 7.93 and 0.300 mL/min for 2 min before the next measurement. The mass spectrometric measurements were performed with an MS/MS instrument Agilent 1290 Infinity LC/Agilent 6460 QQQ (Agilent Corporation, Waldbronn, Germany). The optimized instrumental parameters, the retention times and the MRM transitions as well as the calibration and validation data of the method were given in the previous paper.⁷¹

For quantification of COC and EME, the respective deuterated internal standards were used. For CUS, CIN and TRO, for which deuterated standards were not available, EME-d3, COC-d3, or BE-d3 were applied. Only trans-CIN was used as reference substance for calibration of cis- and trans-CIN which were not separated under the chromatographic conditions. Since HYG was not available as a reference substance, only relative concentrations were calculated as the peak areas divided by the EME-d3 peak area and the sample weight.

Results and discussion

GC-MS results (mean of four extraction experiments) and LC-MS/MS results (one extraction experiment) are shown in Tables 1 and 2. There were no significant differences in the results between the extractions from large and small coca leaves. From the GC-MS peak areas related to the sum of all five peaks in Table 1, it follows that COC and CIN were well extracted from the coca leaves and were found mainly in the acidic re-extract from kerosene C and in the

coca paste D whereas EME, HYG, and CUS remained to a high extent in the coca leaves B and were only in traces or not detected in C and D. This was also confirmed by the quantitative LC-MS/MS data in Table 2 with the exception of EME which appeared in lower concentrations also in the coca paste. TRO was mostly found in the coca paste but was not completely extracted.

These results suggest that HYG and CUS were poorly extracted with kerosene and were not precipitated with the coca paste at alkaline pH from the acidic re-extract. Kerosene is a non-polar and hydrophobic mixture of saturated hydrocarbons with 12 to 15 carbon atoms and a boiling temperature between 200 and 300 °C. The different behaviour of HYG, CUS, and to some extent also EME in comparison to COC and CIN can be explained by the higher hydrophilicity and the much lower solubility in kerosene as it can also be concluded from the partition coefficient between n-octanol and water log P_{ow} which is 3.08 ± 0.38 for cocaine and only 0.28 ± 0.27 , 0.72 ± 0.35 and 0.23 ± 0.37 for HYG, CUS and EME,⁷² and from the formation of a crystalline trihydrate of cuscohygrine. It explains also the short retention times of HYG, CUS, and EME in reversed phase HPLC which led to the choice of a HILIC column in the present study.

Conclusion

The loss of HYG and CUS in the first steps of illegal cocaine production is the essential prerequisite for their use as markers of chewing coca leaves in contrast to the different kinds of illegal cocaine consumption, for instance smoking coca paste that is frequent in Latin America. This is why HYG and CUS have not been detected in urine samples of consumers of cocaine^{23,61} and only in low traces in the hair of some German cocaine users.⁷³ It is a limitation of this study that only coca leaves from one area of one country were utilized. Furthermore, for exclusion of cocaine abuse in addition to coca chewing, further evidence is necessary, for instance the analysis of anhydroecgonine methyl ester as a marker of cocaine smoking and the combination of additional criteria proposed in a previous paper.⁷⁴

This study is preliminary in character; more experiments about the behaviour of HYG and CUS in alternative extraction procedures and further steps of the illegal cocaine production are in progress.

References

- [1] Argentine Federal Law 23737 (1989) Art.15. Last modification Law 26052 (2005). Available at: <http://www.infoleg.gov.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=138109> [March 2016].
- [2] J. M. Moore, J. F. Casale, R. F. Klein, D. A. Cooper, J. Lydon. Determination and in-depth chromatographic analyses of alkaloid in South American and greenhouse-cultivated coca leaves. *J. Chromatogr. A* 1994, 659, 163.
- [3] R. L. Glass, M. B. Johnson. Analysis of cuscohygrine in coca leaves by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 1996, 19, 1777.
- [4] R. L. Glass. Analysis of hygrine and cuscohygrine in coca leaves using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3114.
- [5] C. Rubio, S. Strano-Rossi, M. J. Tabernero, L. Anzillotti, M. Chiarotti, A. M. Bermejo. Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Sci. Int.* 2013, 227, 60.
- [6] C. Rubio, S. Strano-Rossi, M. J. Tabernero, L. Anzillotti, M. Chiarotti, A. M. Bermejo. Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 2014, 243, 30.

Table 1. Relative GC-MS peak areas of coca alkaloids determined for the coca leaf extraction steps A, B, C, and D (cf. Figure 2).

Step	Description	GC-MS peak area, % ^a				
		COC	EME	CIN	HYG	CUS
A	Dried fresh coca leaf	84.3	4.7	5.8	2.4	2.8
B	Extracted coca leaf	5.4	41.0	n.d.	23.7	29.9
C	Acidic re-extract from kerosene	78.4	0.14	20.2	0.29	0.97
D	Coca paste	96.9	n.d.	3.1	n.d.	n.d.

^a Mean of four extractions, relative to the sum of the peak areas of all five substances; n.d. = not detected

Table 2. Concentrations of coca alkaloids determined by LC-MS/MS for the coca leaf extraction steps A, B, and D (cf. Figure 2).

Step	Description	Concentration, % by weight					
		COC	EME	CIN	TRO	HYG ^a	CUS
A	Dried fresh coca leaf	0.88	0.97	1.66	0.083	1.1	0.41
B	Extracted coca leaf	0.007	0.05	0.047	0.013	0.77	0.48
D	Coca paste	79.6	3.4	16.8	0.064	0.002	0.002

^a Relative concentration of HYG, calculated as the peak area divided by the EME-d3 peak area and the sample weight.

- [7] N. C. Rubio, M. Hastedt, J. Gonzalez, F. Pragst. Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. *Int. J. Legal Med.* 2015, 129, 69.
- [8] J. M. Moore, J. F. Casale. In-depth chromatographic analyses of illicit cocaine and its precursor, coca leaves. *J. Chromatogr. A* 1994, 674, 165.
- [9] J. M. Moore, J. F. Casale. Cocaine profiling methodology - recent advances. *Forensic Sci. Rev.* 1998, 10, 13.
- [10] E. J. Magalhães, C. C. Nascentes, L. S. Pereira, M. L. Guedes, R. A. Lordeiro, L. M. Auler, R. Augusti, M. E. de Queiroz. Evaluation of the composition of street cocaine seized in two regions of Brazil. *Sci. Justice* 2013, 53, 425.
- [11] S. F. Lapachinski, G. G. Okai, A. dos Santos, A. V. de Baires, M. Yonamine. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian Federal Police. *Forensic Sci. Int.* 2015, 247, 48.
- [12] N. Stojanovska, M. Tahtouh, T. Kelly, A. Beavis, S. Fu. Qualitative analysis of seized cocaine samples using desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS). *Drug Test. Anal.* 2015, 7, 393.
- [13] J. Broséus, S. Huhtala, P. Esselva. First systematic chemical profiling of cocaine police seizures in Finland in the framework of an intelligence-led approach. *Forensic Sci. Int.* 2015, 251, 87.
- [14] J. F. Casale, R. F. X. Klein. Illicit Production of Cocaine. *Forensic Sci. Rev.* 1993, 5, 95.
- [15] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Material. UNODC, Vienna 2012.
- [16] Shroomery.org. Cocaine extraction from Coca Leaves. Available at http://files.shroomery.org/cms/5884387-cocaine_extraction.pdf [12 December 2015].
- [17] B. Dräger. Analysis of tropane and related alkaloids. *J. Chromatogr. A* 2002, 978, 1.

Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for discrimination between chewing of coca leaves and cocaine abuse. (RESUMEN PÓSTER-TIAFT-Firenze 2015)

N. C. RUBIO¹, M. HASTEDT², F. KRUMBIEGEL², F. PRAGST²

¹ Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Patagonia, Argentina; ² Institute of Legal Medicine, University Medicine Charité, Berlin, Germany.

Introduction: Hygrine and cuscohygrine are two alkaloids of coca leaves that are proposed as good markers in urine and hair for differentiation of the traditional and legal use of coca leaves for chewing in Argentina vs. the illegal use of cocaine. Their absence in street cocaine seizures can be explained by the loss of some coca alkaloids during the illegal processes of extraction and purification of cocaine from the leaves. In this work, it was investigated at which step of cocaine production hygrine and cuscohygrine are lost.

Methods: The production of illicit cocaine can be achieved in a number of ways. We followed the technique outlined in the Cocaine Manual UNODC. The fresh and dried coca leaves (A) were crushed, mixed with water, lime and kerosene and stirred for 2h. Then, the kerosene is separated from the extracted coca leaves (B) and back-extracted with diluted sulfuric acid in water. At this point the kerosene is discarded and the aqueous layer is made alkaline with ammonia, which results in precipitation of crude cocaine together with the more basic alkaloids. The product is then filtered and dried to give coca paste (C). For analysis, aliquots of (A), (B) and (C) were extracted with tert-butyl methyl ether (TBME) or by a mixture of methanol/acetonitrile/2 mM ammonium formate and analyzed by GC-MS and LC-MS/MS under the same conditions reported in previous work for cocaine (COC), ecgonine methyl ester (EME), cinnamoylcocaine (CIN), tropacocaine (TRO), cuscohygrine (CUS) and hygrine (HYG).

Results and Discussion: After extraction with kerosene HYG, CUS as well as EME remain almost completely in the residual coca leaves (B) whereas COC and CIN are found in the coca paste (C). This can be explained by the much higher solubility of COC in the non-polar kerosene in comparison to HYG, CUS and EME as it can also be concluded from the partition coefficient between n-octanol and water log Pow which is 3.08 ± 0.38 for cocaine and only 0.28 ± 0.27 , 0.72 ± 0.35 and 0.23 ± 0.37 for HYG, CUS and EME.

Conclusion: The loss of HYG and CUS in the first steps of the illegal cocaine production is essential for using them as markers in order to distinguish chewing coca leaves from the different kinds of illegal cocaine consumption, for instance from smoking coca paste that is frequent in Latin-American.

Key word: coca alkaloids, illicit production, cocaine, hygrine and cuscohygrine.

cuscohygrine hygrine

¹ Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Patagonia, Argentina; ² Institute of Legal Medicine, University Medicine Charité, Berlin, Germany

Concentrations of Coca alkaloids determined by LC-MS/MS (%)

ANALYTES	CSGA VALUES	EXTRACTED CSGA VALUES	CSGA RESIDUE
CDC	0.88	0.902	79.1
CIN	1.06	0.942	16.8
CUS	0.41	0.48	0.009
WISC ¹	1.1	0.77	0.002
EMR	0.97	0.09	3.4
TRO	0.089	0.09	0.064

¹Wisconsin Department of Health Services

Forensic Science International 227 (2013) 40–43; Forensic Science International 243 (2014) 50–54; Int. J. of Legal Med. 2015;129 (1): 66–8.

LA ELIMINACION DE LA HIGRINA Y CUSCOHIGRINA EN LAS PRIMERAS ETAPAS DE LA PRODUCCION ILICITA DE COCAÍNA POR EL METODO ACIDO CONFIRMA LA UTILIDAD DE ESTOS MARCADORES PARA DIFERENCIAR MASCADORES DE HOJA DE COCA DE CONSUMIDORES DE COCAINA. (RESUMEN PÓSTER-TIAFT-Perú 2015)

Rubio N.C.⁽¹⁾; Marquez, C.⁽²⁾; Confalonieri A.⁽²⁾; Castiglione J.L.⁽²⁾

¹Laboratorio de Toxicología –San Martín 565 Cipolletti-RN-Patagonia- cristinarubio2@gmail.com

²Centro de Alta Tecnología Analítica (CATA)-B.Mitre-Munro 3690-BsAs. www.analytical.com.ar/

CATA.

INTRODUCCION: la higrina y cuscohigrina se han propuesto como dos marcadores para diferenciar entre mascadores de hoja de coca y consumidores de cocaína. En este trabajo se analizan las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por la vía ácida, para determinar a qué nivel se produce la pérdida de estos dos alcaloides que justifiquen su no aparición en la cocaína ilícita consumida.

METODO: se han propuesto dos métodos de producción de cocaína ilícita vía extracción por solvente y vía ácida, en este trabajo analizamos el comportamiento de la higrina y cuscohigrina por la vía de extracción ácida, se empleó un equipo Agilent CG 7890 A triple Quad 7000 A, columna HP-5MS, empleado en modo scan (singleQ) y MSMS modo dMRM. Las condiciones cromatográficas fueron reportadas en trabajos previos. Se analizaron higrina, cuscohigrina, cocaína, metilecgonina, cinamoilcocaína, tropococaína.

Cuatro alícuotas de 5g de hoja de coca son maceradas con H₂SO₄ diluido, la solución ácida es removida y filtrada (A), se agrega carbonato (o cal) precipitando la pasta de coca cruda, se adiciona kerosene, se separa éste (B) y se deshecha la solución acuosa alcalina (C) y se re-extrae el kerosene con solución de H₂SO₄ diluido, se aísla la solución ácida y se hace nuevamente alcalina precipitando la pasta de coca que es filtrada y secada (D). Las fracciones (A) y (C) son extraídas con metil terbutil eter (MTBE), previa alcalinización de la fracción (A). La fracción (D) es disuelta en metanol y la fracción (B) se analiza directamente.

RESULTADOS Y DISCUSION: Los resultados se expresan como porcentaje de área de cada compuesto sobre la sumatoria de todas las áreas de los compuestos analizados. La higrina y cuscohigrina quedan mayoritariamente retenidas en la fracción acuosa alcalina que se deshecha (C), pasando éstas al kerosene (B) en muy bajo porcentaje: la higrina (0,60%) y cuscohigrina (0,01%) reduciéndose aún más en la pasta de coca (D). La menor solubilidad de la higrina y cuscohigrina en la fracción de kerosene puede ser explicada por el coeficiente de partición entre el n-octanol y agua log Pow que es 3.08 ± 0.38 para la cocaína y solo 0.28 ± 0.27 , 0.72 ± 0.35 y

0.23±0.37 para higrina, cuscohigrina y metilecgonina.

CONCLUSION: en la extracción por vía ácida la pérdida de la Higrina y Cuscohigrina se produce en las primeras etapas de la producción de la cocaína, (al igual que en la extracción por solvente TIAFT-Firenze2015) esto confirma su utilidad para diferenciar los mascaradores de hojas de coca de los consumidores de cocaína incluso de la pasta de coca fumada.

Palabras clave: alcaloides de coca, producción ilícita de cocaína, higrina y cuscohigrina

Key word: coca alkaloids, illicit production, cocaine, hygrine and cuscohygrine

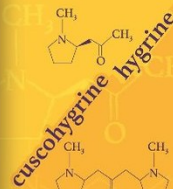
PRESENTACION EN POSTER- AREA: ANALITICA



La eliminación de la HIGRINA y CUSCOHIGRINA en las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascaradores de hoja de coca de consumidores de cocaína

RUBIO, N.C.¹; MARQUEZ, C.²; CONFALONIERI, A.²; CASTIGLIONE, J.L.²

¹ Laboratorio de Toxicología, San Martín 365 Ciudad de Río, Paraguay – cristianarubio@gmail.com / ² Centro de Alta Tecnología Analítica (CATA), 8 Aldea Muro 3650, Bs. As. – www.analytical.com.ar/CATA



GC/MS/MS

INTRODUCCIÓN

La **Higrina** y **Cuscohigrina** se han propuesto como dos marcadores para diferenciar entre mascaradores de hoja de coca y consumidores de cocaína. En este trabajo se analizan las primeras etapas de la producción ilícita de

cocaína por la vía ácida, para determinar a qué nivel se produce la pérdida de estos dos alcaloides que justifiquen su no aparición en la cocaína ilícita consumida.

ESQUEMA DE PRODUCCIÓN ILÍCITA DE COCAÍNA A PARTIR DE HOJAS DE COCA

Extracción vía ácida- Casale JF y col- FSIReview 5,95-107 (1993)



COMPUESTO	Ión precursor	Ión producto	Energía de colisión
Higrina	141	84	5
Higrina	141	42	20
Metilecgonina	199	96	5
Metilecgonina	199	82	5
Metilecgonina	199	42	20
Cuscohigrina	224	209	5
Cuscohigrina	224	140	5
Cuscohigrina	224	98	5
Cuscohigrina	224	84	5
Cocaína	303	182	10
Cocaína	303	82	10
Tropococaína	245	124	10
Tropococaína	245	94	10
Tropococaína	245	82	10
Cinamoltocaína	329	182	10
Cinamoltocaína	329	96	10
Cinamoltocaína	329	82	10

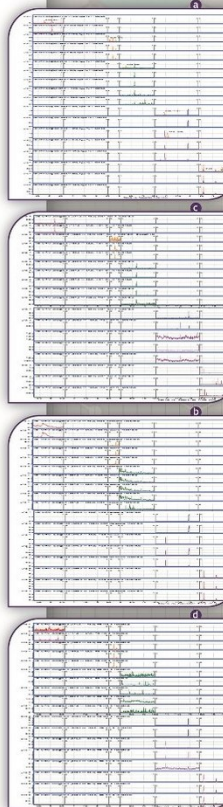
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **Higrina** y **Cuscohigrina** quedan mayoritariamente retenidas en la fracción acuosa alcalina que se desecha (C). HVG 66.82%, CUS 5.43%, EME 13.50%, pasando estas al kerosene (B) en muy bajo porcentaje: HVG 0.56%, CUS 0.09% y EME 0.09% reduciéndose aún más en la pasta de coca (D), en donde mayoritariamente encontramos COC. La menor solubilidad de la HVG, CUS y EME en la fracción de kerosene puede ser explicada por el coeficiente de partición entre el n-octanol y agua log Pow que es 3.08 para la COC y solo 0.88 para la HVG, 0.79 para la CUS y 0.79 para la EME.

CONCLUSIÓN

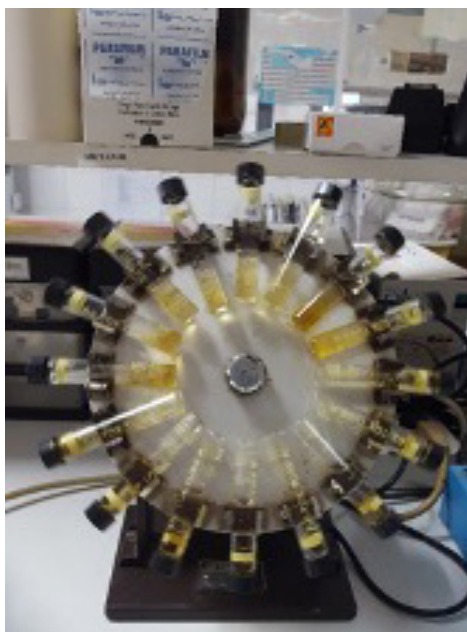
En la extracción por vía ácida la pérdida de la **Higrina** y **Cuscohigrina** se produce en las primeras etapas de la producción de la cocaína, (al igual que en la extracción por solvente TIAFT-Firenze2015) esto confirma su utilidad para diferenciar los mascaradores de hojas de coca de los consumidores de cocaína incluso de la pasta de coca fumada.

Forensic Science International 229 (2013) 60–65; Forensic Science International 243 (2014) 20–24; Int. J. of Legal Med. 2015, 129 (5) 89–94; Proton TIAFT-FIRENZE2015



6.4 GRUPO B: ESTUDIOS REALIZADOS EN ORINA.

6.4.1 Hallazgo de los marcadores de mascado de hojas de coca. HIGRINA Y CUSCOHIGRINA. Estudio de una población de masadores de hoja de coca del norte argentino, una población de consumidores de España y muestras de secuestro o alijos de cocaína.



La orina fue la matriz sobre la que comenzamos a trabajar en la búsqueda de algún marcador y sobre la que dimos los primeros pasos en la dilucidación de las estructuras de la higrina y cuscohigrina. Se estableció un límite de detección para la cuscohigrina para CGMS, se estudiaron no solo orinas de masadores frecuentes del norte de la Argentina, sino consumidores de cocaína de España y muestras de secuestro, en las que fuimos confirmando que la higrina y cuscohigrina solo era detectada en la orina de los que

consumían alguna forma de las hojas de coca y no el producto purificado (cocaína). (*Forensic Science International* 227 (2013) 60–63; *Forensic Science International* 243 (2014) 30–34).

Finalmente, con los siguientes trabajos en otras matrices (pelo, fluido oral) se fueron consolidando la higrina y cuscohigrina como buenos marcadores del mascado de las hojas de coca o consumo de té de coca.

En el *Capítulo 5 (sección 5.4.2)*, se detallan los pasos que se siguieron para dilucidar y confirmar la estructura de ambos marcadores.

6.4.2 Primeras investigaciones sobre la estabilidad del testigo de cuscohigrina y de los alcaloides higrina y cuscohigrina en orina.

Identificadas las estructuras de la higrina y cuscohigrina, la estabilidad de estos dos alcaloides en muestras biológicas durante su conser-

vación y también la del testigo era un punto a investigar y requerido en toda validación de método, no existían antecedentes en la bibliografía sobre este tema.

En orina hicimos un primer estudio para conocer la estabilidad de estos dos nuevos compuestos. Una consulta que es frecuente en el ámbito Judicial, que será uno de los sitios de aplicación de estas investigaciones, es si es posible reanalizar una muestra perteneciente a una causa Judicial después de meses o incluso años y obtener los mismos resultados.

Peters F. (2007) se refiere a las estabilidades del estacionamiento de la muestra y las del procesado de la muestra y las divide en 4 tipos de estabilidad que deben ser analizadas:

1. La estabilidad a largo plazo de la higrina y cuscohigrina en la matriz de la muestra, deben repetirse las condiciones de almacenamiento de las muestras imitando situaciones auténticas, es decir el mismo tipo de recipientes, temperatura, con igual/es conservador/es y por un tiempo probable de almacenamiento o al menos el tiempo que la Justicia establece para su conservación.

2. El segundo es la estabilidad de congelación / descongelación, que debe evaluarse porque las muestras a menudo se congelan y descongelan, por ejemplo, para reanálisis.

3. El tercer tipo de estabilidad, se refiere a la estabilidad del análisis durante el procesado de las muestras, cuán estables son los analitos cuando son sometidos a temperatura, extracciones con solventes, cambio de pH, tiempo de preparación de las muestras etc.

4. La estabilidad de la muestra una vez preparada cuando está lista para ser analizada, es otro punto a investigar, teniendo en cuenta la posibilidad que las mismas queden en el auto analizador o deban ser conservados y retrasados sus análisis por imprevistos como inconvenientes instrumentales, o de otro tipo en el laboratorio que impiden su análisis.

Las guías de validación para métodos empleados en el laboratorio de toxicología forense como la guía del SWGTOX (actualmente ANSI/ASB Standard 017, First Edition 2018), exigen medir la estabilidad del punto 2) congelado/descongelado de la muestra (*Stability–Freeze/Thaw*)

en muestras líquidas y el punto 4) de la estabilidad luego de procesada la muestra (*Stability–Processed Sample*).

Es lógico entender por qué en nuestros primeros trabajos en orina, cuando estábamos en la búsqueda de algún compuesto que nos sirviera para realizar la diferenciación de mascarador vs consumidor de cocaína, pensar en la estabilidad de algo que todavía no conocíamos o no teníamos bien identificado y todavía estudiábamos su utilidad, no fuera un tema prioritario en nuestras investigaciones en esos momentos.

Hicimos alguna prueba que fueron publicadas en el *Forensic Science International* 243 (2014) 30–34 sobre el comportamiento del testigo de cuscohigrina sobre el cual no había experiencia, el certificado que acompañaba a este testigo no hacía mención a su estabilidad como tampoco cuál es el solvente en el cual debería ser disuelto, fue sintetizado exclusivamente para nuestro trabajo. Vimos que el testigo de cuscohigrina a una concentración de 10 ug/mL en metanol degradaba en corto período de tiempo, higrina fue uno de los productos de su degradación (en una semana la relación señal:ruido de la cuscohigrina estuvo por debajo de 3, o sea no detectable). En los siguientes trabajos el testigo de cuscohigrina fue disuelto en acetonitrilo, no observándose la desaparición de la cuscohigrina como con el uso de metanol. Es posible que siendo el metanol un compuesto más reactivo actúe sobre la cuscohigrina provocando su degradación. Este es un punto que requiere más estudio o mayor información del proveedor. Las hojas de coca fueron empleadas como fuente de higrina, tampoco tenemos reportes de su estabilidad. También en las muestras de orina analizadas cuatro meses después del primer análisis se observó pérdida en el área de la cuscohigrina y el incremento del área de la higrina, se analizaron las relaciones de área para hacer los resultados comparativos.

Seis años después de los primeros análisis de orina (mascadores de hoja de coca), se repitieron las mismas muestras de orina empleando la misma técnica de extracción y haciendo el análisis instrumental con CGMS y LCMSMS. Las muestras fueron conservadas a -20 C, 1% NaF (w/v), pH ~ 5 por el agregado de 200ul de 1N HCl. (*Microchemical Journal* 151 (2019) 104215). En la **Tabla 6-4** se muestran los resultados.

	GCMS (2012)	GCMS (2018)	LCMSMS (2018)
	(nd/d (%+))		
COC	2/13 (86,7%)	4/11 (73,3%)	0/13 (100%)
EME	0/15 (100%)	4/11 (73,3%)	1/12 (92,3%)
tr-CIN	5/10 (66,7%)	8/7 (46,7%)	1/12 (92,3%)
HYG	0/15 (100%)	15/0 (0%)	2/11 (84,6%)
CUS	0/15 (100%)	5/10 (66,7%)	2/11 (84,6%)
Nº DE MUESTRAS	15	15	13

nd: no detectable; d: detectable

Tabla 6-4: Porcentaje de muestras de orina positivas para cocaína, metilecgonina, cinamoilcocaína, higrina y cuscohigrina analizadas en el año 2012 y 2018.

Si bien no pudimos evaluar la real estabilidad de los compuestos en especial higrina, cuscohigrina y cinamoilcocaína porque los estudios no fueron cuantitativos sino cualitativos, es observable por los análisis realizados por CGMS (2018), que algunos compuestos sufrieron algún tipo de degradación o transformación comparándolos con su análisis en CGMS (2012). Si bien es inapropiado hablar de que sean compuestos estables a pesar de su detección pasado tantos años, debemos tener en cuenta que la posibilidad de detectar estos compuestos tiene que ver:

1- Con la concentración inicial de los mismo en las muestras, y esto viene ligado a la frecuencia y cantidad de consumo de hojas de coca, al agregado de compuestos alcalinos durante el mascado que favorecen la extracción de los alcaloides de las hojas de coca además de los factores de orden fisiológico como funcionamiento renal, dilución de la orina, pH etc. En el caso de los mascadores de hoja de coca sabemos que sus orinas pueden contener: cocaína (COC), benzoilecgonina (BE o BEG), metilecgonina o ecgonina metil éster (EME), cuscohigrina (CUS) en el orden de los microgramos por mililitros (ug/mL) según los estudios presentados en formato póster en el 9no Congreso Regional de TIAFT-Uruguay (2013) (**Tabla 6-5**) y en el Congreso Alemán de Toxicología (GTFCh symposium Mosbach-2019) **Tabla 6-6**.



Tabla 6-5: Concentración en orina en ug/mL de cuscohigrina, cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster y ecgonina e higrina (cualitativo) de mascaradores de hoja de coca del norte argentino, con un consumo frecuente de hojas de coca y durante varios años. (LCMSMS)

Póster-TIAFT- 9 no Congreso Regional Latinoamericano - 4 al 8 de noviembre de 2013- Uruguay-

Nro	coquea (años)	Frecuencia diaria	Cantidad (grs)	Tipo de Hoja	Substancia alcalina	Higrina	Cuscohigrina	COC	BEG	EME	EG
1	23	varios	10_20	grande	si	+	404.07				
2	44	1 X semana	5	grande	no	+	10.22	0.148	2.98	1.97	5.22
3	20	varios	10_20	grande	no	+	52.14	3.841	98.81	470.71	185.51
4	2	1 X semana	10	grande	no	+	2.01	nd	0.32	0.17	0.63
5	10	varios	20-25	grande	no	+	11.62	1.189	26.10	18.15	15.80
6	3	1 X semana	5	grande	no	+	2.16	0.532	6.69	5.06	0.73
7	?	1 X semana	5	grande	no	+	0.87	nd	0.15	0.08	0.26
8	26	varios	10_20	pequeña/ grande	si	+	1.86	1.234	8.90	3.94	2.58
9	30	una	5	grande	si	+	32.32	nd	4.08	0.23	3.64
10	20	varios	50	grande	si	+	7.68	1.006	20.63	10.01	3.23
11	6	varios	60	grande	si	+	153.46	171927	560917	1172.70	2764.07
12	2	varios	50	grande	si	+	13.67	2.253	855.46	1863.99	9365.16
13	10	una	5	grande	si	+	1.36	0.579	1.88	0.20	16.71
14	10	una	4	grande	si	+	4.25	0.085	561.10	77.80	230.09
15	36	una	4	grande	no	+	2.35	15.086	363.04	112.86	148.95
16	30	varios	10_20	grande	si	+	95.60	0.105	103.97	57.54	300.91
17	5	varios	10_20	grande	si	+	8.48	0.362	17.74	15.26	19.63
18	16	varios	10_20	pequeña	si	+	3.24	nd	7.15	2.05	1.70
19	10	una	5	grande	si	+	7.36	2.405	20.00	20.94	12.96
20	10	varios	30	grande	no	+	13.61	0.178	20.48	12.56	9.65
21	12	varios	300	grande	si	+	2.36	nd	19.42	2.90	1.17
22	?	varios	20	pequeña/ grande	si	+	2.75	nd	5.47	0.91	4.17

ORINA

Analyte	Tea drinker #1 female, 33 yrs		Tea drinker #2 male, 33 yrs		Coca chewer #3 female, 59 yrs	
	C _{max}	t _{max}	C _{max}	t _{max}	C _{max}	t _{max}
BE	1191 ng/ml	47,9 h	1835 ng/ml	54,2 h	20407 ng/ml	> 72 h
EME	2782 ng/ml	47,9 h	1872 ng/ml	44,7 h	26770 ng/ml	> 72 h
m-OH-BE	82,6 ng/ml	18,6 h	25,6 ng/ml	20,5 h	65,25 ng/ml	55,0 h
m-OH-COC	52,6 ng/ml	4,8 h	24,1 ng/ml	8,0 h	106 ng/ml	42,0 h
CUS	191 ng/ml	46,4 h	106 ng/ml	68,3 h	7076 ng/ml	> 72 h
COC	15,1 ng/ml	4,8 h	2,24 ng/ml	20,5 h	2758 ng/ml	9,0 h
AEME	1,68 ng/ml	3,5 h	-	-	11,8 ng/ml	7,0 h
CIN	11,5 ng/ml	3,5 h	33,4 ng/ml	26,7 h	226 ng/ml	14,0 h

Table 1: Maximum concentrations (C_{max}) and detection times (t_{max}) of several analytes in urine from tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

m-OH-BE: meta hidroxí benzoilecgonina.

m-OH-COC: meta hidroxí cocaína.

AEME: anhidro ecgonina metil éster.

CIN: cinamoilcocaína.

Poster- GTFCh symposium Mosbach-2019

Tabla 6-6: Concentración en orina de alcaloides y metabolitos de cocaína de tres voluntarios: dos bebedores de té de coca y un masticador de hojas de coca. (LCMSMS).

Póster -GTFCh symposium Mosbach-2019.

Es interesante observar en la **Tabla 6-6** la presencia en los voluntarios (uno de té de coca y el mascador de hojas de coca) la presencia de anhidroecgonina metil éster (AEME). AEME es un marcador de fumado de cocaína base. La cocaína base se origina en uno de los pasos intermedios en del proceso de producción de clorhidrato de cocaína o bien la obtención posterior por alcalinización del clorhidrato de cocaína, comúnmente conocido como “crack”.

m-OH-BE: meta hidroxí benzoilecgonina y m-OH-COC: meta hidroxí cocaína son metabolitos de la benzoilecgonina y cocaína que fueron agregados al monitoreo en este estudio, sobre los cuales no puede sacarse mayores conclusiones con estos pocos resultados.

Las ventanas de detección en orina para la benzoilecgonina (BE), la ecgonina metil éster (EME) y la cuscohigrina (CUS) tanto para los bebedores de té de coca como para el mascador de hojas de coca está cercana a las 48 h y mayor de 72 h respectivamente; mientras que para la cocaína (COC) y cinamoilcocaína (CIN) dentro de las 24 h. (Zytows-

ki E. 2018).

En el GRUPO E se detallará la ventana de detección en orina de un mascador voluntario de hojas de coca al cual se le extrajo conjuntamente sangre (plasma).

2- Por otro lado, hacer las mediciones con instrumentos más sensibles como LCMSMS permiten ampliar el tiempo de ventana de detección. (Tabla 6-4).

6.4.3 El empleo de sustancias alcalinas durante el mascado puede modificar el patrón de eliminación de los alcaloides en orina.

En el poster presentado en el 9no Congreso Regional Latinoamericano de TIAFT (4 al 8 de noviembre de 2013- Uruguay), se mostraron datos preliminares de cómo el mascado de hojas de coca con sustancias alcalinas aumentaría la eliminación de los alcaloides y metabolitos analizados en orina: cocaína (COC), ecgonina metil éster (MEG), benzoilecgonina (BEG), ecgonina (EG) y cuscohigrina (CUS). La higrina como ya mencionamos solo es medida cualitativamente porque no se dispuso del testigo.

En la **Tabla 6-7** se muestran los mismos resultados, pero normalizados con el valor de la creatinina urinaria⁹ (no publicados). El análisis estadístico con la prueba T de Student encuentra diferencia estadística significativa en orina ($\alpha=0,01$), en todos los compuestos analizados, entre los mascadores de hojas de coca frecuentes que usan una sustancia

⁹La expresión de la concentración de los resultados de sustancias y/o sus metabolitos se refieren en relación a la creatinina que es determinada en la misma muestra de orina. La creatinina es empleada frecuentemente para corregir los fenómenos de dilución o saturación excesivas que pueden ocasionarse en situaciones puntuales.

La creatinina es un producto final endógeno del metabolismo humano. Su paso o aclaramiento desde la sangre al túbulo renal se realiza por filtración glomerular, no se reabsorbe por los túbulos renales y es teóricamente proporcional a su concentración en sangre. Puesto que la excreción de creatinina permanece relativamente constante para cada sujeto, mientras que el volumen de excreción urinario puede variar apreciablemente, se utiliza el nivel de creatinina en la orina como índice al que referir los valores de sustancias y/o sus metabolitos que se eliminan de igual forma a través de la filtración y no se reabsorben.

alcalina durante el mascado (bicarbonato o yista) y aquellos mascadores de hojas de coca frecuentes que no agregan compuestos alcalinos mientras mascan.

		µg/mg creatinina					
		Higrina	Cuscohigrina	Cocaína	BEG	EME	EG
Mas.H.C. (c/a) n=14	Media	Positiva	24,41	15,24	603,01	200,59	338,65
	DS		52,40	41,43	1487,77	462,29	722,01
	Minimo		0,48	nd	0,67	0,07	1,93
	Máximo		200,43	149,30	5470,10	1707,21	2588,13
Mas.H.C. (s/a) n=8	Media	Positiva	3,99	1,61	39,74	14,28	17,13
	DS		3,75	3,70	88,71	27,05	36,13
	Minimo		0,68	nd	0,12	0,06	0,21
	Máximo		10,09	9,98	240,28	74,70	98,58
Prueba T-Student α=0,01 Mas.H.C. (c/a) vs (s/a)			SI	SI	SI	SI	SI

Mas.H.C. (c/a): mascadores de hoja de coca con agregado de sustancia alcalina.
Mas.H.C. (s/a): mascadores de hoja de coca sin agregado de sustancia alcalina.
n= número de muestras de orina de mascadores frecuentes de hoja de coca analizados

Tabla 6-7: Resultados de alcaloides de la hoja de coca y metabolitos en orina de mascadores frecuentes de hoja de coca con y sin el empleo de sustancias alcalinas. Prueba T-Student entre ambos grupos.

Referencias

Frank T. Peters, F.T. Stability of analytes in biosamples—an important issue in clinical and forensic toxicology? Anal Bioanal Chem (2007) 388:1505–1519.

Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. Journal of Analytical Toxicology 2013; 37:452–474.

Zytowski E. Detection of various coca alkaloids in coca leaves and human specimen to proof the consumption of natural coca products via LC-MS/MS. Research thesis. Charité Berlin Institute of Forensic Medicine Department of Forensic Toxicology. 2018.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensiint

Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing[☆]

C. Rubio^a, S. Strano-Rossi^b, M.J. Taberero^c, L. Anzillotti^b, M. Chiarotti^b, A.M. Bermejo^{c,*}^a Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Patagonia, Argentina^b Institute of Legal Medicine, Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italy^c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 11 October 2012

Keywords:

Cocaine markers
Coca chewing
Cocaine abuse
Workplace drug testing
GC/MS

ABSTRACT

Cocaine abuse is widespread all over the world, and is performed generally by sniffing, injecting or smoking cocaine or crack. The distinction between the recreational use of cocaine from the practice of the so called “coqueo” is still an issue in those countries where this habit is diffused and where it is not considered an addiction, by this reason is necessary to develop a method for to distinguish the coca chewers and cocaine abusers. The use of an unique marker to distinguish between cocaine abuse and chewing of coca leaves is of fundamental importance in those countries where this habit is diffused. Certain alkaloids of the leaves of *Erythroxylum coca* are lost during the process of extraction/purification of cocaine and it is not possible to find them neither in seizures of chlorhydrate of cocaine nor urine samples of cocaine abusers. These markers are the hygrine and cuscohygrine that are present in the leaves of *E. coca*.

A fast GC/MS method involving a liquid:liquid extraction procedure with tertbutylmethylether (TBME) is proposed for the determination of some alkaloids in cocaine leaves, cocaine seizures and biological samples. All specimens were alkalized to pH 9 with a carbonate/bicarbonate buffer and then extracted with TBME. The analysis was carry out by GC/MS with electron impact at 70 eV and in full scan mode. The results demonstrate that hygrine and cuscohygrine are not found neither in the urine of cocaine abusers nor in cocaine seizures. For this reason this compounds could be considered as markers of coca chewing.

This developed method permits to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing through the analysis of urine samples.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

While the abuse of cocaine represents today a very relevant legal and public health issue, its consumption coexists with coca leaf chewing that is common among some of the indigenous Latin American populations. Furthermore, the consumption of coca tea (Mate de coca) is also common to all sectors of society within the Andean countries which due to their geographical locations high above from sea level, is widely regarded to be beneficial to health and thus does not represent a legal issue. Most of this latter sort of

consumption is still based upon chewing coca leaves in the traditional way, mixing them with small quantities of an alkaline substance such as *ilucta* (a preparation of the ashes of the quinoa plant) to soften the leaves and to activate the alkaloids. Such an activity is named differently as *mambear*, *chacchar* or *acullicar* (from quechua language) or *coquear* (in northern Argentina). In stark contrast, drug consumption in the more advanced countries involved the powdered hydrochloride salt form of cocaine which can be snorted or injected. Also, a form known as crack results from a chemical process of cocaine leading to a rock crystal, which, once heated, generates vapors that are smoked.

The present paper deals with procedures able to detect whether drug consumption conforms to cultural or abuse forms by means of measurement of selective metabolites in various biological matrices. The distinction is relevant from a forensics perspective since “coqueo” in many of the regions where it is customarily used is not considered as an addiction whereas abuse of the hydrochloride form is. This becomes particularly relevant for workplace control in places where the “coqueo” practice is not considered a

[☆] This paper is part of the special issue entitled “The 50th Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)”, June 3–8, 2012, Hamamatsu, Japan. Guest edited by Adjunct Professor Einosuke Tanaka and Associate Professor Masaru Terada.

* Corresponding author at: Institute of Legal Medicine, Faculty of Medicine, San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain. Tel.: +34 881812216; fax: +34 881812459.

E-mail address: anamaria.bermejo@usc.es (A.M. Bermejo).

law offense [6], while cocaine abuse is. To such an avail, cocaine use by the determination of cocaine and its metabolites can be easily performed through chromatographic and mass-spectrometric techniques [1–3]. In some cases it is also possible to assess whether consumption originates from abuse through the detection of certain metabolites such as anhydroecgonine methyl ester (AEME) in the case of smoking crack (AEME can also be formed as an analytical artifact in the hot GC injection port) [4], and cocaethylene in the simultaneous use of cocaine and ethanol [5]. At any rate, the use of a single marker to distinguish between cocaine abuse and that resulting from chewing of coca leaves is of fundamental importance in those countries where this habit is widespread. For such an end, its worth mentioning that certain alkaloids from leaves of *Erythroxylum* coca are lost during the chemical process of extraction/purification of cocaine. It is thus the aim of the present paper to contribute to the search of single markers able to distinguish the route followed by the drug into the several relevant media.

As a point of departure, leaves of *E. coca* from different parts of northern Argentina (Salta and Tucumán) were analyzed in order to characterize their content of different alkaloids. As regards the origin of samples of Several cocaine hydrochloride, use has been made of samples taken from seizures from Italy, Argentina and Spain, which were also analyzed as well to determine the alkaloid content. Urine samples from coca chewers and cocaine abusers were also analyzed to determine the different alkaloid content.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and standards

Tert-butyl methyl ether (TBME), sodium carbonate, sodium hydrogen carbonate, sodium chloride, were from Merck (Darmstadt, Germany).

Cocaine, ecgonine, ecgonine methyl ester, benzoylecgonine were from Cerilliant (Austin, TX, USA).

2.2. Sample preparation

2.2.1. Coca leaves

Five different aliquots of coca leaves originating from different sites of northern Argentina were analyzed. Three grams of each type of leave were alkalized using carbonate/bicarbonate buffer (pH 9) in distilled water, left in infusion for 4 h, and subsequently liquid/liquid extracted with 4 mL of TBME. The organic layer was evaporated under a gentle nitrogen stream, reconstituted in 500 μ L of methanol, of which 1 μ L was injected in GC/MS.

2.2.2. Urine samples

Urine samples were obtained from two coca chewers. Also, three healthy volunteers who gave informed consent prior to the study, chewed coca leaves. The volunteers chewed coca leaves (3 g) mixed with an alkaline ash called "llipta" during 3 h. Urine samples were collected in sterile reservoirs before chewing, 3 h after beginning of chewing, and 6 h after chewing, and kept at -20°C until sample preparation.

Urine from cocaine abusers were obtained from twenty forensic cases from the Institute of Legal Medicine of Santiago de Compostela, Spain, from three cases in Cipolletti, Patagonia, Argentina and from three cases in Rome, Italy.

Three milliliters of 20 blank urine samples obtained from laboratory staff members, 3 blank urine samples of volunteers prior chewing coca leaves, 5 urine samples from coca chewers, and 26 from cocaine abusers were alkalized to pH 9 with 1.7 g carbonate/bicarbonate buffer. Sodium chloride was then added. A liquid/liquid extraction was performed with 3 mL of TBME.

The organic layer, after centrifugation, was evaporated under a gentle nitrogen stream, reconstituted in 50 μ L of methanol, of which 1 μ L was injected in GC/MS.

The method was validated for cocaine and EME, taking into account the limit of detection (LOD), evaluated by analyzing scalar dilutions of the analytes in urine, repeatability of the areas, accuracy and specificity by analyzing 23 blank urine and evaluating the presence of interfering peaks at the retention times of the analytes of interest.

2.2.3. Cocaine seizures

Thirty different cocaine seizures coming from Forensic cases from Rome, Italy (20 cases) from Cipolletti Argentina (5 cases) and from Santiago de Compostela, Spain (5 cases) were analyzed by GC/MS after dissolution of the powder in methanol in order to obtain a solution of about 0.1 mg/mL of cocaine.

2.2.4. GC/MS equipment

GC/MS analyses were performed by a Hewlett-Packard 6890A GC coupled with an Agilent 5973N mass selective detector (Agilent, >Little Falls, DE, USA). The GC was equipped with a HP 5% phenylmethylsilicone capillary column (30 m \times 0.25 mm, i.d., 0.25 μ m film thickness, Agilent).

GC injection port was set at 250°C in splitless mode; helium was used as carrier gas at a flow of 1.0 mL/min. The oven temperature was held at 70°C for 3 min, held at 270°C at $25^{\circ}\text{C}/\text{min}$, for 3 min. The mass detector operated in electron impact at 70 eV in full scan, acquiring ions of m/z from 50 to 450.

3. Results

The analyses performed on the extracts of coca leaves showed, as expected, the presence of the main coca alkaloids: cocaine, ecgonine methyl ester and anhydroecgonine methyl ester (as an analytical artifact), tropacocaine, cynnamoylcocaines and two peaks that could be identified by their fragmentation patterns as hygrine (RI = 1109) and cuscohygrine [7,8].

The analysis of the urine samples from all five coca chewers showed (in addition to cocaine and EME) the presence of the peaks at RT 5.78 min and 9.45 min, with the same fragmentation and RI of the two compounds deriving from pyrrolidine derivatives, hygrine and cuscohygrine. The LOD of the method is 10 ng/mL for cocaine and 100 ng/mL for EME, with a good repeatability (CV of areas lower than 10% for both analytes at the LOD) and an accuracy (E% lower than 15% for cocaine at 10 and 100 ng/mL). No interfering peaks were observed at the RT of the analytes (cocaine, EME, hygrine or cuscohygrine).

A typical chromatogram of a coca leaves extract is shown in Fig. 1a, while Fig. 1b shows the chromatogram of a urine sample from a coca chewer collected 6 h after chewing. Mass spectra and fragmentation patterns of hygrine and cuscohygrine are shown in Fig. 2.

The analysis of the urine blank did not show any of the peaks related to coca alkaloids. On the other hand, none of the cocaine seizures analyzed showed the presence of the pyrrolidine derivatives.

None of the urine from forensic cases related to cocaine abuse, analyzed in the same conditions as those from coca chewers, showed the presence of the pyrrolidine derivatives hygrine and cuscohygrine.

As far as quantitative estimates of hygrine and cuscohygrine, lack of adequate standards for both chemicals hindered the quantification for these alkaloids, either in coca leaves or in biological samples. Further progress is expected from availability of such standards which will enable us to further validate the analytical method and determine the LOD and LOQ for these substances.

4. Discussion

The analyses carried out on both coca leaves and on urines of coca chewers showed the presence of at least two main alkaloids, which are derivatives of pyrrolidine, hygrine and cuscohygrine, that are not present in seizures of street cocaine nor in the urine of cocaine abusers. During coca chewing the subject can in fact absorb a higher number of substances present in the leaves. These alkaloids are presumably lost during cocaine preparation. Their absence in street cocaine seizures can be explained by the loss of some known coca alkaloids during the processes of extraction and purification of cocaine from the leaves. In fact, to the authors knowledge, the current literature does not reported on the presence of these alkaloids in street cocaine seizures [9].

The detection of these alkaloids (hygrine and cuscohygrine) that are measurable at high concentrations in urine from coca chewers can thus be a valid marker to distinguish between cocaine abuse and coca leave chewing. They are in fact known as natural components of coca leaves and are in a similar concentration of

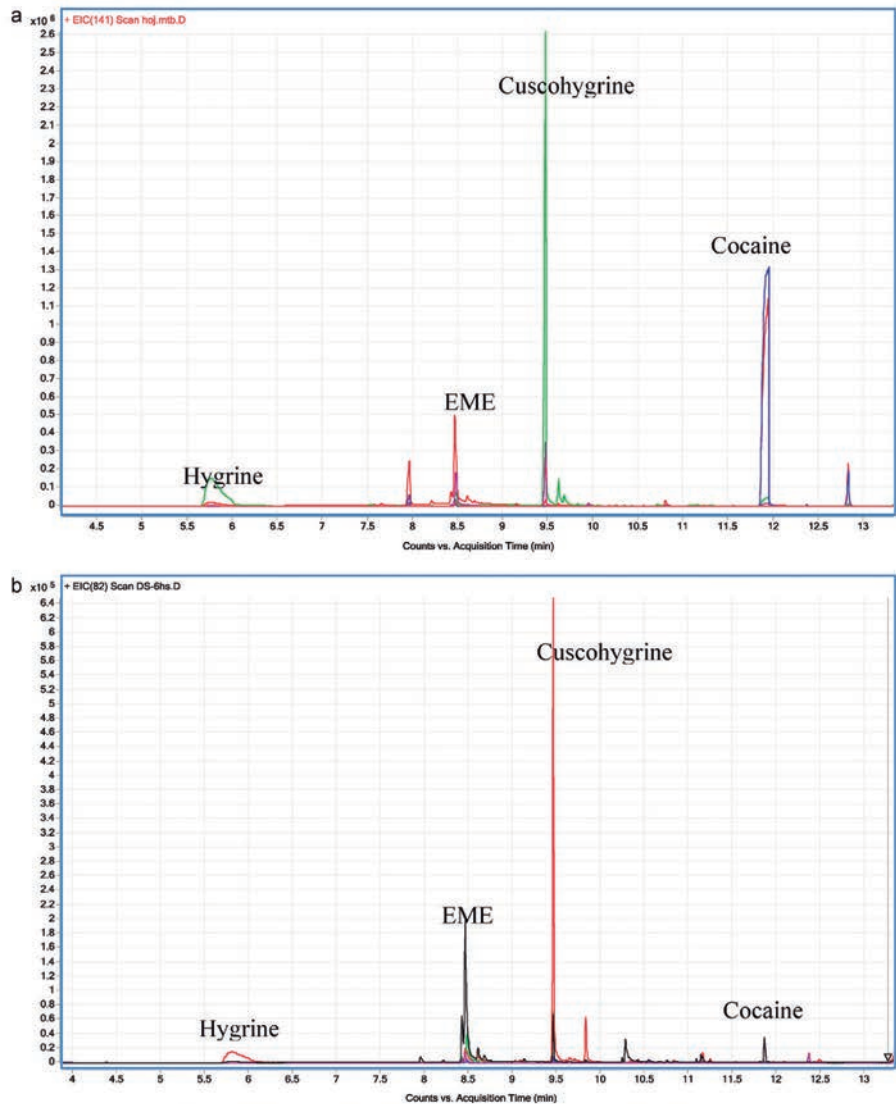


Fig. 1. Ion chromatograms of extracts from coca leaves (a) and coca chewer urine 6 h after chewing (b).

ORINA

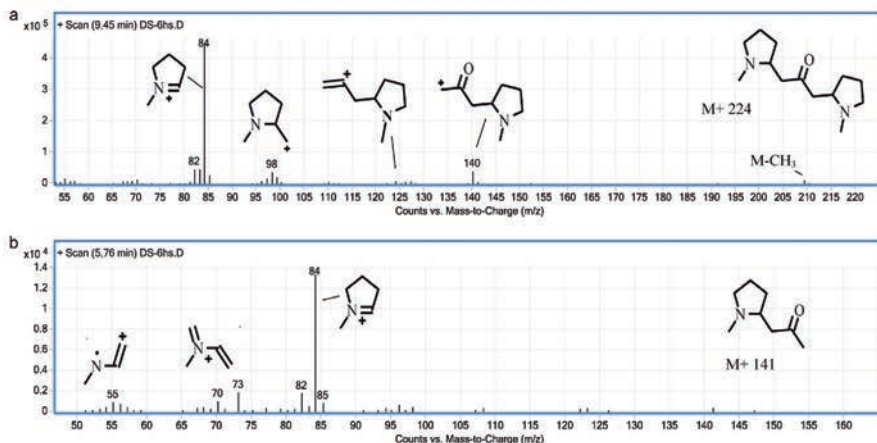


Fig. 2. Mass spectra and postulated fragmentation of cuscohygrine (a) and hygrine (b).

cocaine in coca leaves [7]; they can be therefore easily be detected in those biological samples where cocaine and metabolites are usually determined also when present at low concentrations (urine, blood, hair, oral fluid). The result can thus, provide a useful tool for tests carried at the workplace in countries where coca chewing is permitted.

As stated above, the present communication reports on preliminary work resulting in the finding of two markers that can distinguish coca chewing from cocaine abuse. Further studies are in progress in order to detect other possible markers and to quantify these compounds.

References

- [1] M. Míguez-Framil, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, J.Á. Cocho, M.J. Tabernero, A.M. Bermejo, Electrospray ionization tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of opiates in human hair, *Anal. Chim. Acta* 704 (1–2) (2011) 123–132.
- [2] R. Brunetto Mdel, Y. Delgado, S. Clavijo, Y. Contreras, D. Torres, C. Ayala, M. Gallignani, R. Forteza, V. Cerdá Martín, Analysis of cocaine and benzoylecgonine in urine by using multisyringe flow injection analysis-gas chromatography-mass spectrometry system, *J. Sep. Sci.* 33 (12) (2010) 1779–1786.
- [3] S. Strano-Rossi, A.M. Bermejo, X. de la Torre, F. Botrè, Fast GC–MS method for the simultaneous screening of THC-COOH, cocaine, opiates and analogues including buprenorphine and fentanyl, and their metabolites in urine fast GC–MS method for the simultaneous screening of THC-COOH, cocaine, opiates and analogues including buprenorphine and fentanyl and their metabolites in urine, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (4) (2011) 1623–1630.
- [4] E. Saussereau, C. Lacroix, J.M. Gaulier, J.P. Gouille, On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 15 (2012) 885–886, 1–7.
- [5] P.S. Cardona, A.K. Chaturvedi, J.W. Soper, D.V. Canfield, Simultaneous analyses of cocaine, cocaethylene, and their possible metabolic and pyrolytic products, *Forensic Sci. Int.* 157 (1) (2006) 46–56.
- [6] Argentine Federal Law 26052 Published in the Official Bulletin: 2005 August–Art. 15.
- [7] E.L. Johnson, Content and distribution of Erythroxylum coca leaf alkaloids, *Ann. Bot.* 76 (1995) 331–335.
- [8] L. Robert, J. Glass, Analysis of hygrine and cuscohygrine in coca leaves using gas chromatography and high-performance liquid chromatography, *Agric. Food Chem.* 45 (1997) 3114–3117.
- [9] Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized materials, UNODC, UNITED NATIONS New York, 2012.



Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases[☆]



N.C. Rubio^{a,*}, S. Strano-Rossi^b, M.J. Tabernero^c, J.L. Gonzalez^a, L. Anzillotti^b, M. Chiarotti^b, A.M. Bermejo^c

^a Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Argentina

^b Institute of Legal Medicine Università Cattolica, Rome, Italy

^c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 6 March 2014

Keywords:
Cocaine markers
Coca chewing
Cocaine abuse
Workplace drug testing
GC/MS

ABSTRACT

The objectives of present work are twofold. First, we want to verify that hygrine and cuscohygrine are good markers to distinguish between chewing coca leaves and cocaine abuse. Secondly, we try to develop a quick and easy qualitative method to determine the two mentioned markers.

We analyzed two kinds of urine samples: the first group consisted of twenty-four (24) subjects: urine samples were obtained from various types of workers (e.g. doctors, chemists, nurses, technicians, painters, contractors, employees and some retired persons) who admitted chewing coca leaves. Frequency of the habit of chewing coca leaves was variable. They practiced "coqueo" between two (2) and forty-four (44) years. Sixteen (16) of them used alkaline substances to enhance the extraction of cocaine from the leaves. The second group of urine samples consisted on thirty-eight (38) cocaine abusers, from forensic cases from Spain and Argentina. A GC/MS qualitative method, performed after liquid–liquid extraction, was developed and validated (the parameters studied were selectivity/specificity, LOD and stability), and then applied to the urine samples.

Hygrine and cuscohygrine are good markers to distinguish between chewing coca leaves and cocaine abuse, and the qualitative method presented can be used successfully in workplace drug testing and forensic cases.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Coca leaves have traditionally been used for chewing and brewing tea for centuries among the indigenous population of the Andean region. This practice causes no harm and is known for the health benefits such as overcoming altitude sickness, suppressing pain and fatigue, and aiding digestion.

The traditional method of chewing coca leaf, called "acullico" or "coqueo", consists of keeping a coca leaves ball soaked with saliva

in the mouth together with an alkaline substance that assists in extracting cocaine from the leaves.

Coca leaf was included in the UN Single Convention of Narcotics Drugs in 1961 and therefore subject to international control, however the practice of the so-called "coqueo" (coca leaf chewing) is legal in Argentina [1] and recently also in Bolivia. Today coca leaf chewing is widespread in all sectors of society not only among some of the indigenous Latin American populations or in the Andean countries (which due to their high geographical locations above sea level). The use is widely regarded to be beneficial to health and thus does not represent a legal issue.

The practice of the "coqueo" is not only circumscribed to the northern of the Argentina but is widespread in all the countries. New social groups such as urban middle classes in Latin America, at the moment regularly chew coca leaves. This fact makes it more difficult to distinguish between the "coqueo" and the cocaine abusers. The first is legal in Argentina but the second one is illegal and both are positive for cocaine and their metabolites in urine.

[☆] This paper is part of the special issue entitled "The 51st Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT)", September 2–3, 2013, Funchal, Madeira, Portugal. Guest edited by Professor Helena Teixeira, Professor Duarte Nuno Vieira and Professor Francisco Corte Real.

* Corresponding author at: San Martín 565, Cipolletti, RN, Patagonia, Argentina. Tel.: +54 299 4781049; fax: +54 299 4781049.

E-mail address: crubio@speedy.com.ar (N.C. Rubio).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.forensiint.2014.02.024>

0379-0738/© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

In a previous paper [2] two derivatives of pyrrolidine: hygrine and cuscohygrine were proposed as possible markers for distinguish between “coqueros” and cocaine abusers. During coca chewing a person can in fact absorb a large number of substances present in the leaves. These alkaloids are presumably lost during the process of preparation of cocaine.

It is very important to be able to distinguish these different practices from a forensic perspective. The practice of “coqueo” is not considered an addiction in many of the regions where it is customarily used whereas abuse of the hydrochloride form is an illegal addiction.

The objectives of this paper are twofold. Firstly, we wanted to verify that hygrine and cuscohygrine are good markers to distinguish between chewing coca leaves and cocaine abuse. Secondly, we tried to develop a quick and easy qualitative method to determine the two mentioned markers.

2. Materials and methods

2.1. Biological samples

Twenty-four (24) urine samples were obtained from people who chewed coca leaves. All of them signed an informed consent form before the study.

Volunteers were four (4) women and twenty (20) men aged between 18 and 73 years, and with very different types of work, such as doctors, chemists, nurses, technicians, athletes, painters, contractors, employees and some retired persons.

The frequency of the habit of chewing coca leaves was variable, ranging from once a week (about 10 g of coca leaves) to several times a day (with amounts ranging from 10 to 60 g per day and exceptionally up to 300 g per day). The period of the practice of coca leaf chewing ranged from two (2) to forty-four (44) years. Sixteen (16) of them used alkaline substances to enhance the extraction of cocaine from the leaves. Regarding their medical history: three had hypertension, two both diabetes and hypertension, one was diagnosed with diabetes and the other with depression. None showed signs of cocaine abuse (Table 1).



Fig. 1. Coca leaves: large leaf (bottom) and small leaf (top)

People who chew coca leaves usually consume two different types of coca leaves: both contain hygrine and cuscohygrine. The most frequently consumed coca leaf in Argentina is the large-leaved variety (Fig. 1). A botanical analysis of the leaves to determine to which variety or species of *Erythroxylon* the consumed leaves belonged to was not undertaken. [3]

Twenty-nine (29) cocaine abuser urine samples (two (2) women and twenty-seven (27) men, aged 23–56 years) were submitted from forensic cases of Spain. Most of them had been arrested for drug trafficking and/or robbery, and many had a history of polydrug abuse. Also nine (9) cocaine abuser urine samples were submitted from forensic cases of Argentina (seven men and two women; Table 2).

Table 1
Coca leaves consumption.

NRO	Age/gender	Years of consumption	Frequency of use	Amount (g)	Leaf	Alkaline substance	Cocaine	EME	Hy	CH	C-coc	Other
1	43/m	23	Several time a day	10–20	Large	Yes	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
2	73/f	44	Once a week	5	Large	No	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
3	45/m	20	Several time a day	10–20	Large	No	+	+	+	+	+	–
4	18/m	2	Once a week	10	Large	No	–	+	+	+	–	Nicotine-cotinine
5	70/f	10	Several time a day	20–25	Large	No	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
6	43/f	3	Once a week	5	Large	No	–	+	+	+	–	–
7	29/m	7	Once a week	5	Large	No	–	+	+	+	–	Nicotine-cotinine
8	42/m	26	Several time a day	10–20	Small-large	Yes	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
9	59/m	30	Once a day	5	Large	Yes	–	+	+	+	–	–
10	60/m	20	Several time a day	50	Large	Yes	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
11	25/m	6	Several time a day	60	Large	Yes	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
12	20/m	2	Several time a day	50	–	Yes	+	+	+	+	+	–
13	58/m	24	Several time a day	50	Large	Yes	+	+	+	+	+	–
14	27/m	10	Once a day	5	Large	Yes	–	+	+	+	–	–
15	29/m	10	Once a day	4	Large	Yes	+	+	+	+	+	–
16	48/m	36	Once a day	4	Large	No	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
17	58/m	30	Several time a day	10–20	Large	Yes	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
18	64/m	5	Several time a day	10–20	Large	Yes	+	+	+	+	+	–
19	29/m	10	Several time a day	10–20	Large	Yes	+	+	+	+	+	–
20	32/m	16	Several time a day	10–20	Small	Yes	+	+	+	+	+	Metamizol
21	60/m	10	Once a day	5	Large	Yes	+	+	+	+	+	–
22	37/m	10	Several time a day	30	Large	No	+	+	+	+	+	Nicotine-cotinine
23	66/f	12	Several time a day	300	Large	Yes	+	+	+	+	+	Fluoxetine
24	7/m	?	Several time a day	20	Small-large	Yes	+	+	+	+	+	–

EME, methylecgonine; Hy, hygrine; CH, cuscohygrine; C-coc, cinnamoylcocaine.

Table 2
Cocaine abuser.

NRO	Age/gender	Incident	Coc.	EME	Hy	CH	C-coc
1	25/m	Drug trafficking	–	+	–	–	–
2	24/m	Homicide	–	+	–	–	–
3	39/m	Unknown	–	+	–	–	Nicotine
4	49/m	Unknown	+	+	–	–	Nicotine–6-MAM
5	7/m	Unknown	+	+	–	–	Nicotine–cotinine–olanzapine–methadone–citalopram
6	31/f	Drug trafficking	–	+	–	–	Methadone–codeine
7	32/m	Robbery	–	+	–	–	–
8	23/m	Drug trafficking	–	+	–	–	–
9	27/m	Unknown	+	+	–	–	Nicotina
10	45/m	Robbery	+	+	–	–	Methadone–codeine–nicotine
11	28/m	Drug trafficking	–	+	–	–	Nicotine
12	39/m	Robbery	–	+	–	–	Methadone
13	39/m	Robbery	–	+	–	–	Methadone
14	36/m	Drug trafficking	–	+	–	–	–
15	28/m	Drug trafficking	+	+	–	–	–
16	29/m	Drug trafficking	+	+	–	–	–
17	45/m	Unknown	+	+	–	–	Nicotine–methadone–codeine–6-MAM
18	32/f	Robbery	+	+	–	–	Nicotine–methadone–levomepromazine
19	56/m	Unknown	+	+	–	–	Nicotine–methadone–codeine–6-MAM
20	28/f	Robbery	–	+	–	–	Cotinine–methadone
21	43/m	Unknown	+	+	–	–	Nicotina–methadone–codeine
22	42/m	Robbery	+	+	–	–	Nicotine–methadone–olanzapine
23	44/m	Unknown	+	+	–	–	Nicotine–methadone–codeine
24	43/m	Drug trafficking	+	+	–	–	Nicotine–methadone–cotinine
25	33/m	Robbery	+	+	–	–	Nicotine–methadone–cotinine
26	43/m	Robbery	+	+	–	–	Nicotine–diclofenac
27	35/m	Robbery	+	+	–	–	Nicotine–cotinine
28	52/m	Robbery	+	+	–	–	Nicotine–methadone–codeine
29	37/m	Unknown	+	+	–	–	Nicotine–methadone
30	40/f	Workplace testing	+	+	–	–	Cocaine
31	21/m	Suicide	+	+	–	+	Cocaine–paracetamol
32	19/m	Homicide	+	+	–	–	Ketamine–lidocaine
33	14/f	DFSAs	–	+	–	–	Diclofenac–lidocaine
34	17/m	Overdose	+	+	–	–	Lidocaine
35	56/m	Homicide	+	+	–	–	Cocaine
36	16/m	Overdose	+	+	–	–	–
37	7/m	Homicide	+	+	–	–	Cocaine–lidocaine
38	7/m	Homicide	+	+	–	–	Lidocaine

EME, methylecgonine; Hy, hygrine; CH, cuscohygrine; C-coc, cinnamoylcocaine; DFSAs, drug-facilitated sexual assaults.

2.2. Material

Tert-butyl methyl ether (TBME), sodium carbonate, sodium hydrogen carbonate and sodium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals were of analytical grade. Cocaine, ecgonine methyl ester, were from Cerillant (Austin, TX, USA). Cuscohygrine were from LGC, Milan, Italy.

2.3. Sample preparation

Three milliliters of urine were alkalized to pH 9 with 1.7 g sodium carbonate/sodium bicarbonate buffer (1:1). Sodium chloride was then added. A liquid/liquid extraction was performed with 3 ml of TBME. After centrifugation the organic layer was evaporated under a gentle nitrogen stream, reconstituted in 30 µl of methanol, and then 1 µl was injected into the GC/MS.

2.4. GC/MS equipment

GC/MS analyses were performed on an Agilent GC 7890A, equipped with an HP 7683B autoinjector from Agilent; connected to a 5975C mass selective detector from Agilent.

2.4.1. GC conditions

Chromatographic separation was achieved with a J&W 5% phenylmethylsilicone, 15 m × 250 µm i.d., 0.5 µm film thickness. The injector was maintained at 250 °C and operated for 2 min in splitless mode. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of

1.0 ml/min. Oven temperature was programmed to start at 70 °C for 3 min, then ramped progressively at 25 °C/min up to 270 °C, held constant for 3 min. The injection volume was 1 µl.

2.4.2. MS conditions

The mass selective detector was kept at 230 °C, the ion source at 250 °C, and the quadrupole at 150 °C. The mass analyzer operated in electron impact ionization (EI, 70 eV) and in selected ion SCAN acquisition mode, acquiring ions of *m/z* from 50 to 450.

2.5. Identification of compounds

The identification of compounds (comparing spectra collected to spectra contained in the existing in-house libraries Maurer-2007) and the standards was performed using the full scan acquisition mode, which allowed the analysis of the total ion chromatogram (TIC), extrapolating retention times and characteristic ions.

Retention times were as follows: hygrine (2.517 min), ecgonine methyl ester (6.105 min), cuscohygrine (7.072 min), cocaine (9.235 min), cinnamoylcocaine (10.309).

2.6. Validation of analytical methodology

The analytical validation of the method was performed by establishing selectivity/specificity, limit of detection (LOD), and stability, following the set of validation parameters determined for qualitative methods (Peters et al. [4]).

2.6.1. Selectivity or specificity

Twenty (20) blank urine samples (from different people who were known to have never consumed any illegal drugs) were evaluated for the presence of interfering substances. We did not obtain standards for hygrine and cinnamoylcocaine. The identification of cinnamoylcocaine was made based on the spectra contained in the mass spectral library and its retention index and hygrine could be identified by its specific ions (141, 84, 70 and 55), retention index (RI = 1109) and also using the degraded cuscohygrine standard. Coca leaf extracts were analyzed in our laboratory in order to identify these compounds.

2.6.2. Limit of detection (LOD)

LOD was determined by an empirical method that consists of analysing a series of urine samples containing decreasing amounts of the cuscohygrine analyte: 400 ng/ml, 300 ng/ml, 100 ng/ml. LOD was the lowest concentration that presented a signal-to-noise ratio higher than 3.

2.6.3. Stability

Stability of cuscohygrine standard solution of 10 µg/ml in methanol was measured. Three urine samples were analyzed when received in the laboratory and re-analyzed four months later. During this time the samples were conserved at -20°C , with sodium fluoride (NaF) 1% and their pH was adjusted to 5 with the use of 200 µl of 1 N hydrochloric acid (HCl) solution.

The area ratio between hygrine and cuscohygrine was calculated.

3. Results

The specificity/selectivity of the method was measured and there were no interferences observed at the retention time of analytes.

The LOD was 100 ng/ml for cuscohygrine. For cocaine and EME it was 10 ng/ml and 100 ng/ml respectively with a good repeatability. Precision of the assay, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured concentration values, was lower than 10% for both analyte LOD concentrations. Accuracy was evaluated according to the mean relative error, which was lower than 15% of the theoretical values at each concentration level (10 and 100 ng/ml).

Cuscohygrine is very unstable and degrades rapidly transforming into hygrine (Fig. 2). It can quickly degrade in standard

solutions and urines preserved at -20°C , with NaF 1% and acid pH. The signal in GC–MS scan mode of cuscohygrine standard solution (10 µg/ml) was not detected after a week.

We also studied the stability of hygrine and cuscohygrine in urine samples. The ratios of the areas of hygrine to cuscohygrine were measured when the samples were first received and again four months later. The initial ratios varied between 2% and 6% whereas the four-month old samples varied between 30% and 45%, showing a significant degradation of cuscohygrine to hygrine.

The standard quality certificate of cuscohygrine makes no reference to the stability of the compound or the most suitable solvent for preparing the standard solution.

All the urine samples of people who chewed coca leaves were positive to hygrine and cuscohygrine. The samples positive to cocaine were also positive to cinnamoylcocaine. The metabolite methylecgonine was detected in all the urine samples. Positive results for cocaine, methylecgonine, hygrine, cuscohygrine and cinnamoylcocaine were also obtained in people who did not use an alkaline substance to enhance the extraction of cocaine from the leaves (Fig. 3).

The urine sample no 23 is an exceptional case of a woman who was undergoing treatment with the antidepressant fluoxetine while participating in the study and chewed an extraordinary amount of 300 g of coca leaves a day.

The urine samples of cocaine abusers were all negative to hygrine and cuscohygrine and also except one negative to cinnamoylcocaine. Most urine samples of cocaine abusers also contained other controlled substances.

4. Discussion

Hygrine and cuscohygrine have proven to be good markers to distinguish between chewing coca leaves and cocaine abuse. The pharmacokinetics of cuscohygrine and hygrine is not well known; probably their half-life is longer than that of cocaine and similar to methylecgonine. Hygrine, cuscohygrine and EME were detected in the urine samples from people who chewed coca leaves from once a week to several times a week. In people who consumed only once a week we do not know the time elapsed from consumption to the collection of the urine sample. Due to the instability of the cuscohygrine it is of great importance to analyze the urine samples as soon as possible.

In view of the results obtained, it appears that the qualitative extraction of the components under consideration is not affected

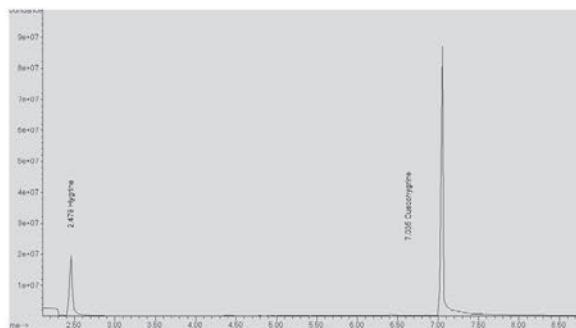


Fig. 2. cuscohygrine standard partially degraded to hygrine.

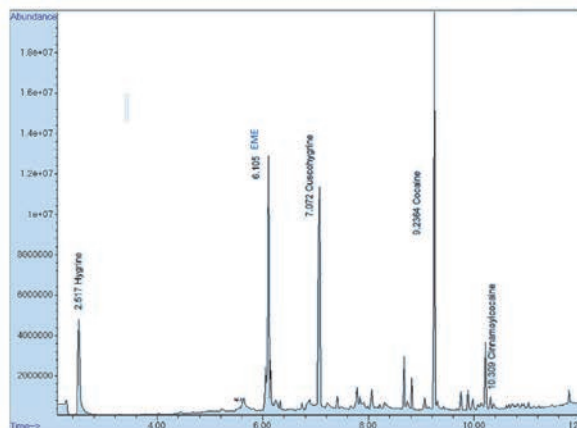


Fig. 3. Urine sample 21-chewing coca leaf-GC-MS scan-hygrine RT = 2.527; EME = ecgonine methyl ester RT = 6.105; cuscohygrine RT = 7.072; Cocaine RT = 9.236 cinnamoylcocaine RT = 10.309.

by the use of an alkaline substance. Although there may be quantitative differences as alkaline substances increase the efficiency of extraction of alkaloids from coca leaves.

In our experience cinnamoylcocaine it is not a good marker to distinguish between chewing coca leaves of cocaine abuse, as it can be found in the urine of cocaine abusers as well as seized cocaine. It was not detected in all the urine samples of people who chewed coca leaves, but it could be used (with hygrine and cuscohygrine) as a qualifier compound that indicates consumption.

Cinnamoylcocaine is another component of the coca leaf. It is oxidized in the illicit production of cocaine by the use of potassium permanganate. The potassium permanganate is not always used because in the illicit production of cocaine very different techniques, quantities and reagents are used.

Benzoyllecgonine is not detected with this analytical method; benzoyllecgonine is not soluble in MTBE.

This work has resulted in a satisfactory qualitative method that allows forensic scientists to distinguish between coca leaf chewing

and the abuse of pure cocaine. It is a very simple method using liquid-liquid extraction for sample clean-up and gives good signals for hygrine and cuscohygrine in selected ion scan mode. The peak areas of hygrine and cuscohygrine in the urine samples obtained from coca leaf chewers were higher than the LOD (100 ng/ml for cuscohygrine).

References

- [1] Argentine Federal Law 26052 Published in the Official Bulletin: 2005 August, Art. 15.
- [2] C. Rubio, S. Strano-Rossi, M.J. Taberner, L. Anzillotti, M. Chiarotti, A.M. Bermejo, Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing, *Forensic Sci. Int.* 227 ((1–3) April) (2013) 60–63.
- [3] Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials. UNODC, United Nations, New York, 2012.
- [4] T. Frank Peters, H. Drummer Olaf, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216–224.



The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years

N.C. Rubio^{a,b,*}, A. Moreda-Piñeiro^b, I. Álvarez-Freire^c, P. Bermejo-Barrera^b,
M.J. Tabernero-Duque^c, A.M. Bermejo^c

^a Toxicology Laboratory, San Martín 565, Cipolletti, RN, Patagonia, Argentina

^b Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

^c Forensic Sciences Institute "Luis Cancheiro" (INCIFOR), Department of Pathologic Anatomy and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, Rúa de San Francisco, s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

1. Introduction

The knowledge of the stability of analytes during storage and handling of samples is very important in forensic toxicology for data interpretation [1]. Samples must be stored in the forensic laboratory until the judicial process has finished. Sample collection time extends to until the time that samples are discarded. The forensic laboratory is obliged to keep the biological samples for a certain period of time in order to re-analyze the samples if required by the attorney or practitioner. The storage periods to which samples can be submitted in forensic cases are very variable, ranging from weeks to months or even years. Drug concentrations may have changed in samples stored in different ways: decrease due to chemical degradation or enzymatic activity, increase due to de novo synthesis or the conversion of metabolites to parent compounds and vice versa, or the concentration of the drugs in the biological samples could remain steady [2].

Forensic toxicologists must be aware of possible changes that can occur during storage and handling of biological samples to do reliable interpretation of toxicology cases.

A number of factors must be considered to affect the stability of the drugs during storage and handling of samples, some of them have been discussed by several authors [1,2].

1. Chemical structure: an ester structures like cocaine are less unstable unless certain appropriate storage conditions are used;
2. Storage condition: time, pH, temperature, the type of sample (urine compared to blood for example) are factors that can affect the rate and spread of the variation of analyte concentrations. For example, stored samples at -20°C , acidic pH, plus the use of preservatives like sodium fluoride (1–2%) are effective in stabilizing the concentrations of several compounds [1,3,4].
3. The specificity and the sensitivity of the analytical method: the use

of a more sensitive method allows the detection of low analyte concentrations and stability studies for longer times (diminished analyte concentrations after long storage times) can be performed. Similarly, the higher the initial concentration, the greater the possibility of detecting the analytes after long storage times

The time required for a court decision in Argentina and in Spain is usually long, and the requests for reanalyzing forensic samples can be possible. The present work studies the possibility to detect several alkaloids of coca leaves [cocaine (COC), methylecgonine (EME), cinnamoylcocaine (CIN), hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS)] in urine from coca leaves chewers from northwest Argentina. Urine samples were storage and handled (they were freeze/thaw at least four times) for 6 years.

Chewing coca leaves or drink coca tea is a current practice in the Andean world (Bolivia, Perú and Argentina), and these practices have grown in several social levels in urban populations in northwest Argentina, especially in the state of Salta and Jujuy [5]. Legislation in Argentina allows these practices [6]. In the last years, several legal disputes have happened to claim about cocaine positive results in urine due to consumption of coca leaves in the traditional way and not due to illegal use of cocaine. Thus, the differentiation between people who chew coca leaves or drink coca tea from people who consume illegal cocaine is very important in the countries where chewing coca leaf is legal because both of them are positive for cocaine and their metabolites in urine, oral fluid and hair. Hygrine and cuscohygrine are two alkaloids proposed for resolving this issue [7–10].

The special focus is over HYG, CUS and trans cinnamoylcocaine (trCIN). HYG and CUS are potential markers that were detected in urine of people who chew coca leaf but they were not found in urine from cocaine abusers. trCIN is considered as a secondary marker. Scarce researches have been published about the stability of these compounds.

* Corresponding author at: Toxicology Laboratory, San Martín 565, Cipolletti, RN, Patagonia, Argentina.
E-mail addresses: cristinarubio2@gmail.com (N.C. Rubio), anamaria.bermejo@usc.es (A.M. Bermejo).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104215>

Received 27 June 2019; Received in revised form 25 August 2019; Accepted 26 August 2019

Available online 04 September 2019

0026-265X/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

2. Objectives

The aims of the present work are:

1. The evaluation of the possibility of detecting COC, EME, CIN, HYG, and CUS in 15 urine samples from regular coca leaves chewers that were storage and handled for 6 years. New data have been obtained using the same GCMS method that was used in the first analysis in 2012 [8].
2. The development of a more sensitive method to detect the same analytes by LCMSMS, discussing the advantages and disadvantages regard to GCMS.

3. Experimental

3.1. Standards, chemicals, and materials

Standard solutions were prepared from COC and EME stock standards (1000 µg/mL dissolved in acetonitrile) supplied by Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Deuterated analogue stock standard solutions were prepared from cocaine- d_3 (COC- d_3) in acetonitrile (100 µg/mL), also from Cerilliant. CUS (10 mg) was from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada). trCIN (20 mg) were from NMI (West Lindfield, Australia). Three working calibration standards (10 µg/mL, 1 µg/mL and 0.1 µg/mL for COC, EME, trCIN, CUS) were prepared in acetonitrile from stock standards. Deuterated internal standards were prepared at a concentration of 10 µg/mL. Working standards were stored at -20°C . Quality controls (QC) samples consisted of a mix of COC, EME, trCIN, and CUS at 100 and 500 ng/mL for GCMS determinations, and at 10, 50, 100 ng/mL for LCMSMS. Deuterated standard were added at a final concentration of 100 ng/mL for GCMS and 25 ng/mL for LCMSMS. Acetonitrile, methanol, and 2-propanol (LC-MS grade) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany), tert-butyl methyl ether (TBME) and formic acid (98%) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain), and ammonium formate (99%) was from Fluka (Steinheim, Germany). Ultrapure water 18 MΩ cm of resistivity was obtained from a water purification device from Millipore Co. (Bedford, MA, USA). Cellulose acetate syringe filters (0.20 µm) were from Labbox Labware S.L. (Barcelona, Spain).

3.2. Instrumentation

Determinations were carried out with two different instruments:

3.2.1. GCMS equipment

An Agilent 6890A gas chromatograph (Santa Clara, CA, USA) equipped with an Agilent 5973N mass spectrometer, and an Agilent HP-5MS capillary column 30 m \times 250 µm i.d. internally coated with 5%-(phenyl) methylpolysiloxane (0.35 µm thick film) were used for GCMS analysis. The injector port of the gas chromatograph was maintained at 250 °C and operated in splitless mode for 2 min and then purged for 2 min. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. Oven temperature started at 90 °C for 1 min, then temperature is increased at 35 °C/min ratio up to 200 °C, and then again at 15 °C/min up to 275 °C. Finally, oven temperature is maintained constant at 275 °C for 10 min. The injection volume was 2 µL.

The mass spectrometer was kept at 320 °C, the ion source at 230 °C, and the quadrupole at 150 °C. The mass analyzer was operated by electron impact ionization (EI, 70 eV) and in selected SCAN acquisition mode (m/z from 40 to 550).

Targets identification by using the retention time was considered positive when retention times varied $\pm 2\%$ regarding the reference sample. The full scan MS mode was used, and spectra comparisons were performed with commercial libraries and in-house libraries. A minimum requirement of four diagnostic ions from the reference spectrum, showing at least 10% intensity regards to the most intense

ion, should be present in the MS for a confirmative identification. Each diagnostic ion should form a chromatographic peak with a height that is at least three times the background (signal-to-noise-ratio $\geq 3:1$) [11].

HYG was not commercially available; and it was identified by GCMS fragmentation patterns from a coca leave extract (84 m/z from methylpyrrolidin and molecular ion 141) [12].

3.2.2. LCMSMS equipment

A 3200 Q TRAP LCMSMS system (ABSciex, Concord, Canada), equipped with a Flexar FX-15 UHPLC binary chromatographic pump (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), and a Flexar UHPLC autosampler (Perkin Elmer) were used for LCMSMS measurements. Analyst 1.6 software (ABSciex) was used for system control and data acquisition; whereas, MultiQuant 2.1 software (ABSciex) was used for data processing. Separations were performed with an Infinity LabPoroshell 120 Hille (2.7 µm, 2.10 \times 100 mm) from Agilent. The column was temperature-controlled with a GECKO 2000 column heater from Amchro GmbH (Hattersheim, Germany).

Chromatographic separation (20 min) was performed at 40 °C under gradient elution using 20 mM ammonium formate in ultrapure water (pH 4.2) as a mobile phase A, and 4:1 acetonitrile/methanol as a mobile phase B (Table I).

Data acquisition parameters for each multi reaction monitoring mode (MRM) transition are listed in Table II. At least two precursor ion \rightarrow product ion transitions were monitored for each analyte for guaranteeing the specificity (the presence of an analyte was confirmed when all qualifier MRM transitions were identified in each chromatographic run). As previously commented, since HYG was not commercially available, this compound was identified based on m/z (precursor ion) $\rightarrow m/z$ (product ion) transitions obtained after infusion of a coca leave extract for mass spectra recording. Optimized ion source parameters (positive ionization) were set at 400 °C for temperature, 5000 V for voltage, 20 for curtain gas, HIGH for collision gas, 20 for ion for source gas 1, and 15 for ion for source gas 2.

3.3. Sample

3.3.1. Collection and storage

Fifteen urine samples collected and analyzed in August 2012 were retested by GCMS under the same methodological conditions. In addition, urine samples were analyzed by LCMSMS.

Urine samples were obtained from people who frequently chewed coca leaves. All volunteers signed an informed consent for allowing the use of the provided urine samples in this study. The samples were stored in 2012 in plastic tubes, adding 200 µL of 1 N HCl (pH close to 5) and 1% NaF. Samples were kept at -20°C . During these 6 years, urine samples were frozen and thawed at least six times to do other tests.

3.3.2. Sample preparation

Urine samples were analyzed following the same extraction procedure that was used in 2012 and published in 2013 [12]. The extraction

Table I
Gradient conditions.

Total time (min)	Flow rate (microliter/min)	A%	B%
0.1	300.00	8.0	92.0
2.0	300.00	9.0	91.0
6.0	300.00	15.0	85.0
11.0	500.00	60.0	40.0
12.0	500.00	60.0	40.0
13.0	500.00	40.0	60.0
14.0	300.00	8.0	92.0
20.0	300.00	8.0	92.0

Mobile phase A: 20 mM ammonium formate in deionized water pH 4.2.

Mobile phase B: acetonitrile:methanol (4:1).

Table II

MS/MS data, Retention times and validation data of coca alkaloids and cocaine metabolites analyzed in urine samples. (LCMSMS).

Analyte name	Precursor ion (amu)	Product ion (amu)	ISTD	RT (min)	DP	EP	CEP	CE	CXP	Matrix effect (20 ng/mL, 500 ng/mL)	LOD (ng/mL)
COC	304.1	182.2	COC-d3	3.29	54.87	4.8	9.57	25.83	2.47	+14%, -0.5%	5
		105.1			53.97	4.46	33.3	39.39	2.47		
		82			53.93	4.55	25.05	39.99	2.28		
		77			53.99	5.13	24.83	80.15	2.48		
EME	200.1	182.2	COC-d3	5.71	52.11	2.18	128	21.96	2.47	-13.4%, -18.9%	10
		82.1			52.16	3.9	10.86	31.21	2.48		
		67.1			52.66	2.18	9.14	61.83	2.3		
		41.1			52.78	2.14	11.92	79.33	5.46		
trCIN	330.2	77.1	COC-d3	3.31	53.35	5.2	31.38	91.87	2.42	+8.3%, +2.9%	5
		182.1			52.91	5.4	33.15	31.17	2.32		
		103.1			53.06	5.32	12.28	62.24	2.46		
		51.1			53.18	4.26	23.66	125.39	2.19		

Analyte name	Precursor ion (amu)	Product ion (amu)	ISTD	RT (min)	DP	EP	CEP	CE	CXP	Matrix effect (100 ng/mL, 500 ng/mL)	LOD (ng/mL)
CUS	225.1	84.1	COC-d3	12.65	49.52	2.17	20.07	23.94	2.68	+34.5%, +22.9%	50
HYG	142.1	42.1	COC-d3	4.8	70	10	9.71	77.64	4.71	n/a	n/a
		84.1			63.92	4.03	11.97	19.72	2.99		
COC d3	307.1	42.1		3.41	64.92	5.09	6.08	52.06	6.08	n/a	n/a
		185.1			54.82	5.04	9.11	25.86	2.48		
		85.1			54.4	5.03	21.08	42.8	2.41		

Amu: atomic mass unit; ISTD: internal standard; RT: retention time; DP: declustering potential; EP: entrance potential; CEP: collision cell entrance potential CE: collision energy, CXP: cell exit potential.
n/a: not applicable.

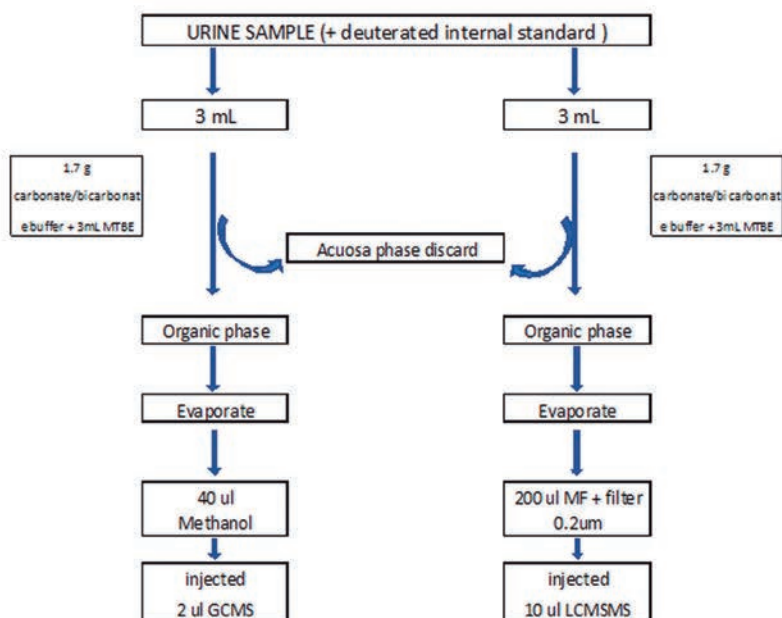


Fig. 1. Extraction urine sample.

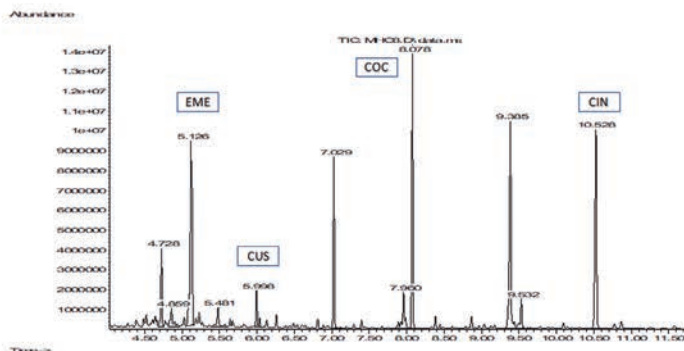


Fig. 2. GCMS chromatogram. The urine extract of coca chewer (8).

procedure was performed in duplicate, and extracts were analyzed once by GCMS and LCMSMS.

The extraction procedure was as follows: (Fig. 1) 3 mL of urine were alkalized to pH 9 with 1.7 g of sodium carbonate/sodium hydrogen carbonate (1:8) buffer. A liquid/liquid extraction was performed with 3 mL of TBME. The organic layer was separated and evaporated under a gentle nitrogen stream. One extract was reconstituted in 40 μ L of methanol for GCMS analysis (injection volume of 2 μ L). The second extract was reconstituted in 200 μ L of mobile phase, filtered (0.20 μ m cellulose acetate syringe filters) and analyzed by LCMSMS (injection volume of 10 μ L). Chromatograms are shown in Figs. 2 and 3.

3.4. Validation

Validation has been established following international recommendations [13,14] for evaluating a qualitative methodology. The validation parameters evaluated in GCMS and LCMSMS method were: carryover, interference studies, limit of detection. In addition, matrix effect (ionization suppression/enhancement) was also evaluated in LCMSMS. GCMS method was revalidated to confirm the previously validation results in 2012 [8].

3.4.1. Carryover

To identify if carryover exists, urine samples containing the analytes at several concentrations were analyzed followed by two blank urine samples.

3.4.2. Interference study

To assess the absence of the potential interferences from urine matrix components, ten drug-free urine were analyzed with the proposed method (without adding internal standards) to determine if there were no chromatographic signals at the retention time coincident with the GC mass spectrum and MRM transitions in LCMSMS for each analyte. In addition, similar experiments were performed adding internal standards (10 ng/mL) to determine if the internal standard could contribute to the analyte response.

3.4.3. Limit of detection: (LOD)

To determine the LOD two fortified urine samples containing decreasing amounts of COC, EME, trCIN, and CUS: 300 ng/mL; 200 ng/mL; 100 ng/mL; 50 ng/mL; 10 ng/mL and 5 ng/mL were analyzed in three different days. The LOD was considered positive when the relation S/N was > 3.

3.4.4. Matrix effect (ionization suppression/enhancement)

The matrix effect (ME) was evaluated by comparing the analyte response of the neat standards (B) to samples spiked post extraction (A): $ME\% = 100 - B/A \times 100$ [15]. Negative values show ion suppression; whereas, positive values mean ion enhancement.

The potential for ME was evaluated in ten blank urine samples at 20 and 500 ng/mL (COC, trCIN, EME), and at 100 and 500 ng/mL (CUS) concentration levels.

4. Results and discussion

4.1. Method validation

Carryover was not detected in GCMS after injecting extracts of urine spiked at 500 ng/mL; however, carryover was detected in LCMSMS for COC after injecting extracts spiked at 50 ng/mL, and for EME and trCIN at 200 ng/mL. Carryover for CUS was not detected at a concentration of 500 ng/mL. Therefore, two blank samples were run after each urine sample analysis to avoid the carryover in LCMSMS. In addition, 2-propanol was used for injector needle rinsing, four times before injection and another four times after sample injection. 2-propanol was LC-MS grade, it was used only for injector needle rinsing. We did not observe any peak with 2-propanol. All of our reactive were checked before and during the running with the injection of blank samples.

No was observed significant interferences in the matrix or internal standard when analyzing the 10 drug-free urine samples in GCMS and LCMSMS.

The LOD was established at 50 ng/mL for COC and trCIN, 100 ng/mL for EME, and 200 ng/mL for CUS by GCMS. These LOD values were higher than those previously obtained in 2012 to COC and CUS (10 and 100 ng/mL, respectively, trCIN was not determined). These differences could be attributed to the fact that the studies were done in different laboratories with different Agilent GCMS system (7890A/5975C (2012) vs 6890A/5973N (2018)). Found LODs for LCMSMS were 5 ng/mL for COC and trCIN, 10 ng/mL for EME, and 50 ng/mL for CUS. ME ratios are shown in Table II. The average suppression and enhancement have not exceeded $\pm 25\%$, except for CUS at a concentration of 100 ng/mL (signal enhancement of +34.5%).

4.2. Results of the urine samples

Table III shows the number of participants in the study, some of their characteristics (age, gender, frequency of coca leaves chewing,

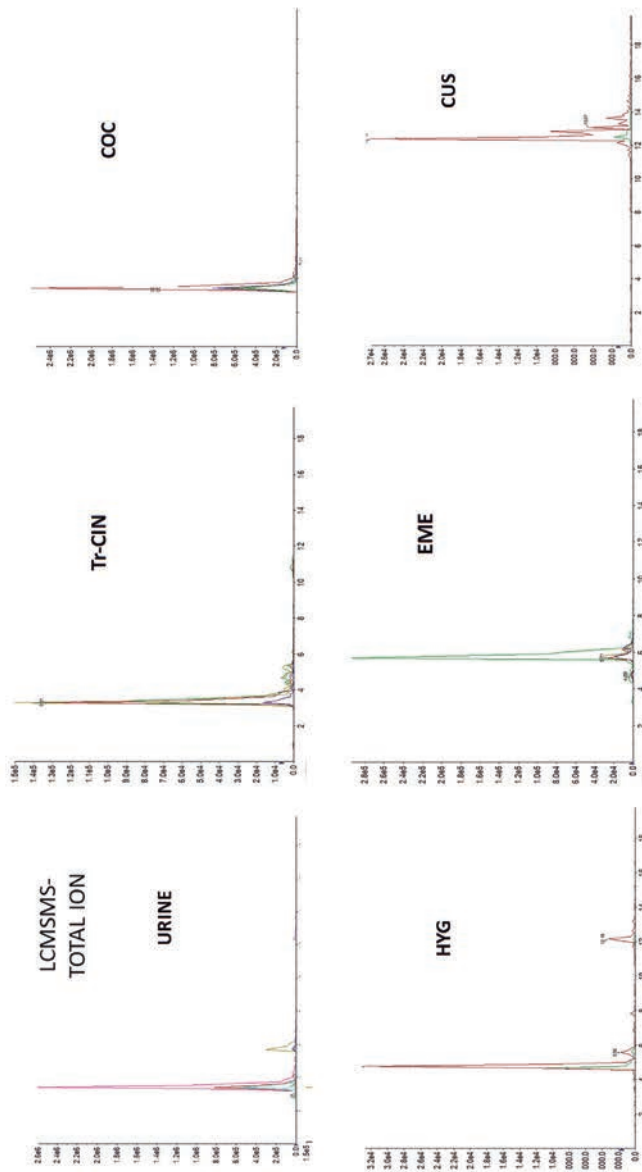


Fig. 3. LCMSMS chromatogram. The urine extract of coca chewer (8).

Table III
Details and results of urine samples of coca leave chewers.

NRO	Method	Age/gender	Profession	Coquea (years)	Daily frequency	Amount (grs)	Alkaline substances	COC	EME	trCIN	HYG	CUS
1	GCMS, 2012	20/m	Mason	2	Several	50	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	nd	+
2	LCMSMS, 2018	64/m	Technical	5	Several	10,20	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2012							+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							IS	IS	IS	IS	IS
3	GCMS, 2012	58/m	Technical	24	Several	50	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							IS	IS	IS	IS	IS
4	GCMS, 2012	42/m	Driver	26	Several	10,20	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
5	GCMS, 2012	66/f	Retired	12	Several	300	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
6	GCMS, 2012	59/m	Locksmith	30	One	5	Yes	nd	+	nd	+	+
	GCMS, 2018							nd	nd	nd	nd	nd
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
7	GCMS, 2012	58/m	Serene	30	Several	10,20	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
8	GCMS, 2012	60/m	Painter	10	One	5	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
9	GCMS, 2012	27/m	Traffic inspector	10	One	5	Yes	nd	+	nd	+	+
	GCMS, 2018							nd	nd	nd	nd	nd
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
10	GCMS, 2012	25/m	Sportsman	6	Several	60	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
11	GCMS, 2012	29/m	Mason	10	Several	10,20	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
12	GCMS, 2012	43/f	Doctor	3	Once a week	5	No	+	+	nd	+	+
	GCMS, 2018							+	+	nd	nd	nd
	LCMSMS, 2018							+	+	nd	nd	nd
13	GCMS, 2012	18/m	Student	2	Once a week	10	No	+	+	nd	+	+
	GCMS, 2018							nd	nd	nd	nd	nd
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
14	GCMS, 2012	?	Driver	?	Several	20	Yes	+	+	nd	+	+
	GCMS, 2018							nd	nd	nd	nd	nd
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+
15	GCMS, 2012	43/m	Doctor	23	Several	10,20	Yes	+	+	+	+	+
	GCMS, 2018							+	+	+	+	+
	LCMSMS, 2018							+	+	+	+	+

IS: Insufficient sample; nd: not detectable.

Table IV
Positive percentage of urine samples.

	GCMS (2012)			GCMS (2018)			LCMSMS (2018)		
	Negative	Positive	(%) positive	Negative	Positive	(%) positive	Negative	Positive	(%) positive
COC	2	13	86.7	4	11	73.3	0	13	100
EME	0	15	100	4	11	73.3	1	12	92.3
trCIN	5	10	66.7	8	7	46.7	1	12	92.3
HYG	0	15	100	15	0	0	2	11	84.6
CUS	0	15	100	5	10	66.7	2	11	84.6

Total number of urine samples: 15 (GCMS).

Total number of urine samples: 13 (LCMSMS).

coca leave amount, etc.), and the GCMS (2012 and 2018) results and LC-MS/MS (2018) results. The percentage of positive samples after the second analysis by GCMS decreases from 13% (COC) to 100% (HYG) (Table IV). The first GCMS analysis (2012) showed 100% positive results for HYG and CUS. However, HYG was not detected in any urine sample in the second analysis by GCMS (2018). On the other hand, the number of positive cases for CUS, COC, EME, and trCIN decreased 33%, 13%, 27% and 20% respectively. These results should be

explained taking into account that the second GCMS equipment (2018) is less sensitive than the first GCMS equipment (2012), also some degradation of the analytes. In the case of the HYG we should mention besides that the HYG shows a low abundance signal in GCMS, in addition, HYG standard is not commercially available, and a concentration-response relationship cannot be attained.

LCMSMS had better performances than GCMS (2018) for all compounds and also for COC and trCIN analyzed by GCMS (2012). It is

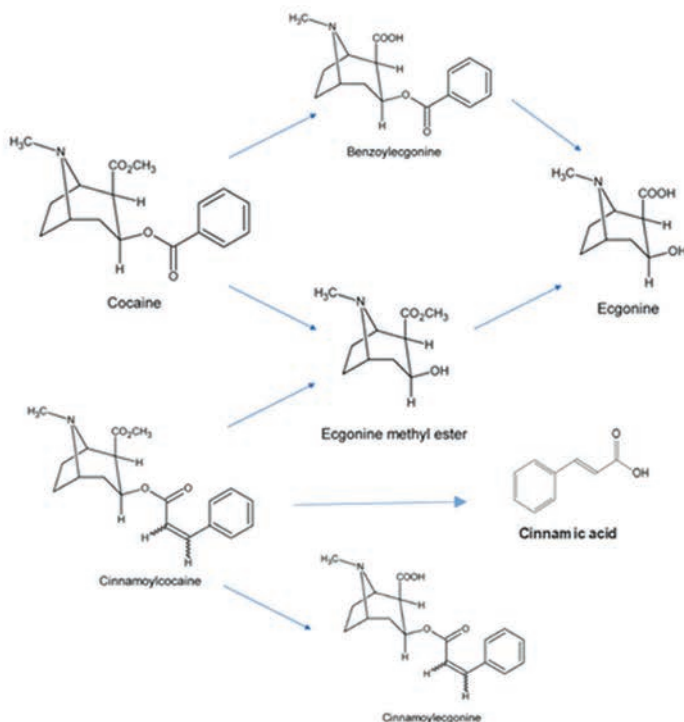


Fig. 4. Cocaine, ecgonine methyl ester, cinnamoylcocaine degradation products.

remarkable the result by LCMSMS of HYG vs the last analysis of GCMS (2018) (84.6% vs 0% samples positive) and CUS (84.6% vs 66.7% samples positive). (Table IV).

5. Conclusion

The possibility of detecting some alkaloids from coca leaf (COC, EME, trCIN, HYG and CUS) in urine samples after long storage (6 years) would be higher if samples are preserved under the conditions used in our study (-20°C , 1.0% (w/v) NaF, and pH close to 5.0). COC was surprisingly found in urine after six storage years. In addition, the use of LCMSMS improves the efficiency of detection. LCMSMS was able to detect all analytes. Figs. 2 and 3 show GCMS and LCMSMS chromatograms for urine sample from subject number 8.

It is well-known that the conservation of urine samples with NaF 1.0% (w/v), acidic pH and temperature below -20°C reduce the decomposition of ester-type drug like cocaine or methylecgonine which are readily hydrolyzed enzymatically and/or chemically (alkaline pH) [16]. However, there is no information about the stability of HYG, CUS and CIN in biological samples. A previous work has shown that CUS is transformed into hygrine in CUS methanolic standard solutions and in urine samples [12]. Cinnamoylcocaine (cis and trans) alkaloids that are co-extracted with cocaine from coca leaf are expected to be degraded

(hydrolysis) into cinnamic acid (cis and trans) and cinnamoyllecgonine (cis and trans) and EME [17].

Negative results for coca alkaloids in urine should be carefully interpreted by forensic toxicologists because of several factors affecting the presence of these substances in urine: frequency of coca leaf (chewing or drinking coca tea) consumption, use of alkaline substances during chewing, partial degradation and original concentration of alkaloids in the first analyzed urine sample. Regarding to the last point, Zytowski [18] has published the maximum concentration of COC, EME, trCIN, and CUS in urine from three volunteers (two subjects who drank one cup of coca tea and one subject who chewed 5 g of coca leaves with an alkaline substance). Results were 15.1, 2.24, and 2758 ng/mL of COC; 2782, 1872, and 26,770 ng/mL of EME; 11.5, 33.4, and 226 ng/mL of trCIN; and 191, 106, 7076 ng/mL of CUS. Urine from coca leaves chewer has a remarkable higher concentration of coca's alkaloids than urines from coca tea drinkers.

These results evaluate not only the long-term stability and freeze/thaw stability of the urine samples, but also includes a third type of stability mentioned by some authors that it is the stability of the analyte under the conditions of sample preparation [19,20]. The use of alkaline pH during the extraction of the urine samples must be taken into account due to favor the chemical hydrolysis of the analytes that have ester-moieties like COC, EME, trCIN and probably CUS's ketone group

(Fig. 4 shows the degradation products). The change of the extraction method without alkaline conditions would be another point to be considered to improve the detection of these analytes.

The current work is a qualitative method that is unable to establish the transformation/degradation ratio of the alkaloids under study, and hence, their stability. The limitation in the volume of urine samples has not allowed analysis in duplicate. The GCMS equipment used and the laboratory were different in GCMS analysis (2012 and 2018). In addition, the long storage time (6 years) makes difficult to maintain the same analysis conditions prior and after storage. These factors have hampered to perform a more precise stability evaluation.

Finally, HYG and CUS are two new alkaloids studied in biological samples and their stability needs to be more deeply researched.

Funding

The authors are grateful for the financial support provided by the Dirección Xeral de I + D – Xunta de Galicia (Project number 6RC2014/2016 Grupos de Referencia Competitiva), and European Regional Development Fund (FEDER) project number GPC2014/035.

Compliance with ethical standards

The authors declare therefore that all volunteers have signed an informed consent for allowing the use of the provided urine sample in this study.

Declaration of competing interest

None.

References

- [1] F.T. Peters, Stability of analytes in biosamples—an important issue in clinical and forensic toxicology? *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1505–1519, <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1267-2>.
- [2] N. Lappas, C.M. Lappas, Storage stability of analytes. Chapter 7, *Forensic Toxicology: Principles and Concepts*, 2015, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799967-8.00007-4>.
- [3] M. Kiszka, G. Buszewicz, R. Mydno, Stability of cocaine in phosphate buffer and in urine, *Z. Zagadnień Nauk Sądowych* 44 (2000) 7–23.
- [4] D.S. Ierscheid, B.S. Levine, Y.H. Caplan, A comprehensive study of the stability of cocaine and its metabolites, *J. Anal. Toxicol.* 13 (1989) 250–256.
- [5] M.E. Santoni, G. Torres, La Coca (*Erythroxylum coca*). Masticando su historia, <http://www.antrópologico.gov.ar/coca.pdf> (Accessed November 2015).
- [6] Argentine federal law 23737, art.15. O.B. October 10, 1989, <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/0-4999/138/138-138.htm>, (1989), Accessed date: 15 January 2018.
- [7] N.C. Rubio, M. Hantelt, J. Gonzalez, F. Pragt, Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios, *Int. J. Legal Med.* 129 (1) (2014) 69–84.
- [8] N.C. Rubio, S. Strano-Rossi, M.J. Tabernero, J.L. Gonzalez, L. Anzillotti, M. Chiarotti, A.M. Bermejo, Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 30–34, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.02.024> (Epub 2014 Mar 6).
- [9] N.C. Rubio, P. Bermejo-Barrera, A. Bermejo, A. Moreda-Piñeiro, Development of a reliable method for assessing coca alkaloids in oral fluid by HPLC-MS/MS, *J. Anal. Toxicol.* 43 (3) (2018), <https://doi.org/10.1093/jat/bky076> November.
- [10] N.C. Rubio, F. Krumhiegel, F. Pragt, D. Thurnmann, A. Nagel, E. Zytowski, M. Aranguren, J.C. Goñelo, N. Poliansky, Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of “paco” (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations, *Forensic Sci. Int.* 297 (2019) 171–176.
- [11] Guidelines for quality control in forensic-toxicological analyses (GTFCh 20090601).pdf, <https://www.gtfch.org/cms/images/stories/Bases/Guidelines%20for%20quality%20control%20in%20forensic%20toxicological%20analysis%20%28GTFCh%2020090601%29.pdf>, (June 2009).
- [12] N.C. Rubio, S. Strano-Rossi, M.J. Tabernero, L. Anzillotti, M. Chiarotti, A.M. Bermejo, Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing, *Forensic Sci. Int.* 227 (2013) 60–63.
- [13] F. Peters, O. Drummer, F. Mushoff, New validation method, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216–224.
- [14] Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), Standard practices for method validation in forensic toxicology, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 452–474.
- [15] H. Trufelli, P. Palma, G. Famigliini, A. Cappiello, An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509.
- [16] B.K. Logan, K.L. Peterson, The origin and significance of ecgonine methyl ester in blood samples, *J. Anal. Toxicol.* 18 (March/April 1994).
- [17] L.M. Jones, D.K. Boudreau, J.F. Casale, “Crack” cocaine: a study of stability over time and temperature, *B.S. Microgram J.* 6 (3–4) (2008) July – December.
- [18] E. Zytowski, Research thesis, Detection of Various Coca Alkaloids in Coca Leaves and Human Specimen to Proof the Consumption of Natural Coca Products Via LC-MS/MS, Charité Berlin Institute of Forensic Medicine Department of Forensic Toxicology, 2018.
- [19] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D.L. Massart, R.D. McDowall, b Validation of bioanalytical chromatographic methods, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 193–218.
- [20] D. Dadgar, P.E. Burnett, Issues in evaluation of bioanalytical method selectivity and drug stability, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1995) 23–31.

.....Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing.

N.C. Rubio¹, S. Strano-Rossi², M.J. Tabernero³, L. Anzillotti², M. Chiarotti², A.M. Bermejo³

¹Forensic Toxicology laboratory. Cipolletti. (Argentina), ²Institute of Legal Medicine Università Cattolica. Rome. (Italy), ³Institute of Legal Medicine. Universidad de Santiago de Compostela. (Spain).

Introduction. Cocaine abuse is widespread all over the world, and is performed generally by sniffing, injecting or smoking cocaine or crack. The habit to chew coca leaves mixed with an alkaline medium (coqueo) is a phenomenon limited to some geographic areas, such as north-western Argentina (NOA) and other areas of South America. Nevertheless, the distinction between the recreational use of cocaine from the practice of the so called “coqueo” is still an issue in those countries where this habit is diffused and where it is not considered an addiction. In fact, especially in workplace drug testing, the “coqueo” practice is not considered a law offence, while cocaine abuse is; the use of a unique marker to distinguish between cocaine abuse and chewing of coca leaves is of fundamental importance in those countries where this habit is diffused. Certain alkaloids of the leaves of *Erythroxylum coca* are lost during the process of extraction/purification of cocaine. The objective of the present work has been the search for unique markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse.

Methods. 3 mL of 10 blank urine samples, 5 urine samples from coca chewers, 20 from cocaine abusers and 3 grams of five different aliquots of coca leaves originating from different sites of NOA were alkalized to pH 9 with a carbonate/ bicarbonate/ sodium chloride buffer and subsequently liquid/liquid extracted with TBME. The organic layers were evaporated and then were injected in GC/MS

Results. The analyses performed on the extracts of coca leaves showed, as expected, the presence of the main coca alkaloids: cocaine, ecgonine methyl ester and anhydroecgonine methyl ester (as analytical artifact), tropacocaine, cynnamoylcocaines and two peaks that could be identified by their fragmentation patterns as hygrine (RI=1109) and cuscohygrine. The analysis of the urine samples from all five coca chewers showed (in addition to cocaine and EME) the presence of the peaks at RT 5.78 min and 9.45 min, with the same fragmentation and RI of the two compounds deriving from pyrrolidine, hygrine and cuscohygrine. None of the urine from forensic cases related to cocaine abuse, analyzed in the same conditions as those from coca chewers, showed the presence of the pyrrolidine derivatives hygrine and cuscohygrine. On the other hand, none of the cocaine seizures analyzed showed the presence of the pyrrolidine derivatives.

Conclusions. The detection of the alkaloids hygrine and cuscohygrine at high concentrations in urine from coca chewers can be a valid marker to distinguish between cocaine abuse and coca leave chewing. These alkaloids are presumably lost during the processes of extraction and purification of cocaine from the leaves. This can be, in principle, useful in workplace testing in countries where coca chewing is permitted.

Keywords: cocaine markers, coca chewing, cocaine abuse, workplace drug testing.





• Argentine Federal Law 26652 Published in the Official Bulletin: 2005 August - Art. 15. • Johnson E.L. (1995). *Annals of botany* 76: 331-335. • Robert L. Glass, J. (1997) *Agric. Food Chem.* 45: 3114-3117.

Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases.

(RESUMEN PÓSTER TIAFT MADEIRA 2013)

N.C. Rubio¹, S. Strano-Rossi², M.J. Tabernero³, J.L. Gonzalez¹, L. Anzillotti², M. Chiarotti², A.M. Bermejo³

¹Forensic Toxicology Laboratory. Cipolletti. (Argentina), ²Institute of Legal Medicine Università Cattolica. Rome. (Italy), ³Institute of Legal Medicine. Universidad de Santiago de Compostela. (Spain).

General abstracts: Coca leaves have traditionally been used for chewing and brewing tea for centuries among the indigenous population of the Andean region. This practice is not harmful and is known for its health benefits such as overcoming altitude sickness, suppressing pain and fatigue, and aiding digestion. Coca leaf was included in the UN Single Convention of Narcotics Drugs in 1961 and therefore subject to international control, however the practice of the so called “coqueo” (coca leaf chewing) is legal in Argentina and recently also in Bolivia. The practice of the “coqueo” is not only circumscribed to the northern of the Argentina but is widespread in all the countries. New social groups such as urban middle classes in Latin America at the moment regularly chew coca leaves. This fact makes more difficult to distinguish between “coqueo” and cocaine abuse. The first is legal in Argentina but the second one is illegal and both result in positive findings for cocaine and its metabolites in urine. It is very important to differentiate the two habits both from a forensic perspective and in workplace drug testing. The practice of “coqueo” is not considered an addiction in many of the regions where it is customarily used whereas abuse of the hydrochloride form is an illegal addiction. In a previous work we suggested hygrine and cuscohygrine as possible markers for distinguishing the two habits. The objectives of present work are two. First, we want to verify that hygrine and cuscohygrine are good markers to distinguish between chewing coca leaves and cocaine abuse. Secondly, we try to develop a quick and easy qualitative method to determine the two mentioned markers.

We analyzed two kinds of urine samples: the first from workers admitting to chew coca leaves, the second from forensic cases involving cocaine abusers. The first group consisted of twenty-four (24) subjects: urine samples were obtained from various types of workers (e.g doctors, chemists, nurses, technicians, painters, contractors, employees and some retired) who admitted chewing coca leaves. Frequency of the habit of chewing coca leaves was variable, ranging from once a week (about 10 grams of coca leaves) to several times a day (with amounts ranging from 10 to 60 grams per day and exceptionally up to 300 grams per day). They practiced “coqueo” between two (2) and forty-four (44) years. Sixteen (16) of them used alkaline subs-

tances to enhance the extraction of cocaine from the leaves the second group of urine samples consisted on thirty-eight (38) cocaine abusers, from forensic cases from Spain and Argentina. A GC/MS qualitative method, performed after liquid-liquid extraction, was developed and validated (the parameters studied were selectivity/specificity, LOD and stability), and then applied to the urine samples.

Conclusions: The specificity/selectivity of the method was measured and there were not interferences at the retention time of analytes. The LOD was 100 ng/ml for cuscohygrine. Cuscohygrine is very unstable and degrades rapidly transforming into hygrine. It can quickly degrade in standard solutions and urines preserved to -20°C, with FNa 1% and acid pH. Stability of cuscohygrine standard solution of 10 micrograms/milliliters in methanol is less than one week. The relation of areas between hygrine and cuscohygrine when the urine samples were received in the laboratory was from 2% to 6%. When these samples were re-analyzed four months later these relations was from 30% to 45%. All the urine samples of people who chewed coca leaves were positive to hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and methylecgonine. Positive results for cocaine, methylecgonine, hygrine, cuscohygrine and cinnamoylcocaine were also obtained in people who did not use alkaline substances to enhance the extraction of cocaine from the leaves. The urine samples of cocaine abusers were all negative to hygrine and cuscohygrine and except one were also negative to cinnamoylcocaine. Most urine samples of cocaine abusers had also other controlled substances, such as methadone, opiates and cannabis. Thus, hygrine and cuscohygrine are good markers to distinguish between chewing coca leaves and cocaine abuse, and the qualitative method presented can be used successfully in workplace drug testing and forensic cases.

key word: Cocaine markers; Coca chewing; Cocaine abuse; Workplace drug testing; GC/MS.

Application of Hygrine and Cuscohygrine as possible markers to distinguish

COCA CHEWING from COCAINE ABUSE on WDT and forensic cases

N.C. Rubio¹; S. Strano-Rossi²; M. J. Tabernero³; J. L. Gonzalez¹; L. Anzillotti²; M. Chiarotti²; A.M. Bermejo¹

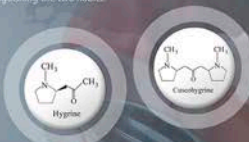
¹ Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti (Argentina); ² Institute of Legal Medicine Università Cattolica, Rome (Italy); ³ Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela (Spain)

Coca leaves have traditionally been used for chewing and brewing tea for centuries among the indigenous population of the Andean region. The practice of the "coqueo" is not only circumscribed to the northern of the Argentina but is widespread in all the countries. New social groups such as urban middle classes in Latin America at the moment regularly chew coca leaves. This fact makes more difficult to distinguish between

"coqueo" and cocaine abuse. The first is legal in Argentina but the second one is illegal and both result in positive findings for cocaine and its metabolites in urine. It is very important to differentiate the two habits both from a forensic perspective and in workplace drug testing. In a previous work we suggested hygrine and cuscohygrine as possible markers for distinguishing the two habits.

Objectives

- 1° We want to verify that hygrine and cuscohygrine are good markers to distinguish between chewing coca leaves and cocaine abuse.
- 2° We try to develop a quick and easy qualitative method to determine the two mentioned markers.



Coca Chewers

Sample	Hygrine	Cuscohygrine	EMT	COCAINE	CINAMOMYLOCAINE	HYGRINE	CUSCOHYGRINE
1. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
2. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
3. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
4. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
5. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
6. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
7. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
8. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
9. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
10. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
11. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
12. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
13. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
14. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
15. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
16. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
17. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
18. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
19. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
20. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
21. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
22. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
23. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
24. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
25. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+

Results

COC= Cocaine
EME= Methylenedioxymethylamphetamine
HY= Hygrine
CH= Cuscohygrine
COC= Cocaine
AEME= Amphetamine
Methyl Ester

Sample preparation

Three milliliters of urine were added to 100 µL of 1% TFA. The mixture was vortexed and then filtered through a 0.45 µm filter. The filtrate was then injected into the HPLC system. The HPLC system was composed of a C18 column (150 x 4.6 mm, 5 µm) and a mobile phase of 0.1% TFA in water/0.1% TFA in acetonitrile (70:30). The flow rate was 1.0 mL/min. The detection was performed at 210 nm. The results were expressed as the area under the curve (AUC) for each compound.

GC/MS analysis

Agilent GC/MS system equipped with an HP-5MS column (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm film thickness). The injector temperature was 250 °C. The oven temperature was 100 °C for 1 min, then 10 °C/min to 250 °C, and then 5 min. The detector temperature was 300 °C. The results were expressed as the area under the curve (AUC) for each compound.

Consumers

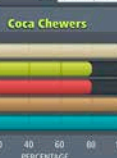
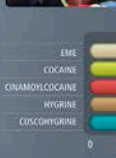
Sample	Hygrine	Cuscohygrine	EMT	COCAINE	CINAMOMYLOCAINE	HYGRINE	CUSCOHYGRINE
1. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
2. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
3. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
4. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
5. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
6. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
7. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
8. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
9. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
10. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
11. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
12. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
13. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
14. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
15. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
16. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
17. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
18. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
19. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
20. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
21. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
22. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
23. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
24. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+
25. 100g coca leaves	+	+	+	+	+	+	+



Coca Chewers	COCAINE	HYGRINE	CUSCOHYGRINE
COCAINE	24/24	100	0/30
HYGRINE	24/24	100	0/30
CUSCOHYGRINE	19/24	79.17	21.83
EMT	24/24	100	100/100



Consumers	COCAINE	HYGRINE	CUSCOHYGRINE
COCAINE	0/30	0	0
HYGRINE	0/30	0	0
CUSCOHYGRINE	27/30	90	71.43
EMT	100/100	100	100



Conclusions

- 1 Hygrine and cuscohygrine have proven to be good markers for distinguishing between chewing coca leaves and cocaine abuse.
- 2 Cinamomylcocaine is not a good marker for distinguishing between chewing coca leaves and cocaine abuse. It is not detected in all the urine samples from people who chewed coca leaves, but it could be used (with hygrine and cuscohygrine) as qualitative compound that indicates "coqueo".
- 3 Benzoylcocaine is not detected with this analytical method. Benzoylcocaine is not soluble in MTBE. AEME can also be formed as an analytical artifact in the hot GC injection port.
- 4 The qualitative method developed has resulted satisfactory for the proposed objectives. It is a simple method using liquid-liquid extraction, without derivatization, with a good signal in scan mode for hygrine and cuscohygrine. Hygrine and cuscohygrine are found in analysis of urine samples belonging to people who chewed coca leaves were higher than LOD (100 ng/mL for cuscohygrine).

DETERMINACION EN ORINA POR UHPLC-MS/MS DE DOS NUEVOS MARCADORES PARA DIFERENCIAR EL MASCADOR DE HOJAS DE COCA DEL CONSUMIDOR DE COCAINA- (RESUMEN POSTER-URUGUAY 2013)

N.C. Rubio¹, S. Strano-Rossi², M.J.Tabernero³, J.L Gonzalez¹, L. Anzillotti², M. Chiarotti², A.M. Bermejo³.

¹Laboratorio de Toxicología Forense. Cipolletti. (Argentina), ²Instituto de Medicina Legal Università Cattolica. Roma. (Italia), ³Instituto de Medicina Legal. Universidad de Santiago de Compostela. (España)) ¹crubio@speedy.com.ar

Palabras clave: Marcadores de cocaína: Mascadores de hoja de coca; Drogas de abuso en el medio laboral; GC/MS.

Introducción: en Argentina el mascado de hojas de coca es una práctica legal, lo que significa un problema desde el punto de vista laboral y forense su diferenciación del consumo de cocaína. En ambos casos, los análisis de orina arrojan resultados positivos para cocaína y sus principales metabolitos - En el proceso de extracción y purificación de la hoja de coca determinados alcaloides de estructura pirrolidinica: hygrina y cuscohigrina se pierden mayoritariamente, no siendo posible su detección en las muestras de calle analizadas de clorhidrato de cocaína y en la orina de consumidores por la técnica de CG/MS (FSI-2012), contrariamente en los mascadores de hoja de coca la hygrina y cuscohigrina son fácilmente detectadas por extracción líquido-líquido seguida de la técnica de CG/MS-

Objetivo: determinar cuali y cuantitativamente la concentración de higrina, cuscohigrina, cocaína y sus metabolitos en la orina de mascadores de hojas de coca del norte de Argentina y comparar con la orina de consumidores de cocaína de España por una técnica de UHPLC MS/MS, Agilent 1290 Infinity detector Agilent 6460 masa triple cuadrupolo, ESI modo positivo-

Muestras: Se analizaron 23 orinas de mascadores habituales de hojas de coca y 20 muestras de orina de consumidores de cocaína de España que no poseen la práctica del mascado de hojas de coca-

Resultados: Límites de detección (ug/ml): Cuscohigrina: 0,010; cocaína: 0,0025; metilecgonina, ecgonina, benzoilecgonina: 0,001. Rangos de concentraciones orina de mascadores en ug/ml: cuscohigrina (0'70-404'07); cocaína (ND-171'93); benzoilecgonina (0'15-5609'17); metilecgonina (0'08-1863'99); ecgonina (0'26-9365'16) e higrina (cualitativa-Positiva en todas las muestras)- Orinas de consumidores: cocaína (0'018-4'59); benzoilecgonina (0'326-90'769); metilecgonina (ND-29'668); ecgonina (0'614-16'304); cuscohigrina e higrina (cualitativa-Negativa en todas las muestras)

Conclusiones: Esta técnica de UHPLC MSMS que como único pretratamiento de la mues-

tra emplea una dilución de la orina 1/40 en fase móvil (H₂O: Acetonitrilo: ácido fórmico) fue adecuada para conocer el rango de concentración de Cuscohigrina y la detección cualitativa de higrina en mascadores habituales de hojas de coca, como así también la distribución urinaria de la cocaína y sus metabolitos y confirmar que estos marcadores no son detectados en consumidores de cocaína-



*1º premio
mejor póster*



1º premio
mejor póster

Determinación en orina por UHPLC-MS/MS de dos nuevos marcadores PARA DIFERENCIAR EL MASCADOR DE HOJAS DE COCA DEL CONSUMIDOR DE COCAÍNA

N. C. Rubio¹, S. Strano-Rossi², M. J. Tobner³, J. L. González⁴, L. Angillotti⁵, M. Chiarotti⁶, A. M. Bermejo⁷
¹Laboratorio de Toxicología Forense, Cipolletti, (Argentina); ²Instituto de Medicina Legal Universidad Católica, Roma (Italia);
³Instituto de Medicina Legal, Universidad de Santiago de Compostela (España); ⁴E-mail: crubio@quimica.org.ar
Palabras clave: Marcadores de cocaína; Marcadores de hoja de coca; Drogas de abuso en el medio laboral.

Introducción

En Argentina el mascado de hojas de coca es una práctica legal, la que significa un problema desde el punto de vista laboral y fomenta la diferenciación del consumo de cocaína. En otros países, los análisis de orina otorgan resultados positivos para cocaína y sus principales metabolitos. El uso frecuente de extracción y purificación de la hoja de coca determinando toxicidad de extractos por técnicas de HPLC y CUSCOH no permiten mayor certeza, no siendo posible su detección en las muestras de orina. Los marcadores de cocaína en la orina de consumidores por la técnica de GC/MS (99-2002), comúnmente en los marcadores de hoja de coca (Higgin y CUSCOH) que se detectan por extracción líquida líquida seguida de la técnica de GC/MS.

Marcadores de Hoja de Coca

No.	Código	Forma de uso	Cantidad (mg)	Tipo de hoja	Substancia	Microgramas / mililitro					
						HI	CUS	COC	BEG	MEG	EG
1	20	varias	10-20	grande	no	44.81	0.270	44.44	44.81		
2	40	1 a semana	8	no	+	12.21	0.148	2.88	1.32		
3	20	varias	10-20	grande	no	12.14	1.841	88.21	187.51		
4	2	1 a semana	20	grande	no	+	2.03	0.01	0.32	0.43	
5	20	varias	10-20	grande	no	+	11.42	1.199	24.26	11.49	
6	1	1 a semana	8	no	+	1.24	0.132	4.48	0.79		
7	2	1 a semana	8	grande	no	+	0.87	0.01	0.15	0.24	
8	20	varias	10-20	grande	no	+	1.84	1.234	8.80	2.58	
9	30	varias	5	grande	no	+	12.51	0.51	0.68	1.44	
10	20	varias	50	grande	no	+	7.61	1.056	22.83	3.33	
11	6	varias	10-20	grande	no	+	151.44	171.507	5405.17	2754.07	
12	2	varias	50	grande	no	+	18.47	2.261	851.44	3365.18	
13	10	varias	5	grande	no	+	1.34	0.575	1.88	16.71	
14	10	varias	4	grande	no	+	4.25	0.583	34.10	292.48	
15	30	varias	4	grande	no	+	2.35	11.080	30.04	149.10	
16	30	varias	10-20	grande	no	+	66.60	0.306	163.07	300.91	
17	5	varias	20-25	grande	no	+	8.84	0.362	17.74	19.45	
18	10	varias	20-25	grande	no	+	1.24	0.01	0.71	1.70	
19	10	varias	8	grande	no	+	7.34	1.855	30.00	11.94	
20	10	varias	10	grande	no	+	11.63	0.378	22.44	9.09	
21	10	varias	100	grande	no	+	1.34	0.01	19.42	4.17	
22	5	varias	100	grande	no	+	0.75	0.01	0.43	0.37	

Medio	Tipo de muestra	HI	CUS	COC	BEG	MEG	EG
		Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio
MEDIO 1 - DROGA	Marcadores	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001
	Marcadores (a/c)	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001
	Marcadores (a/c)	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001
Consumidores	HI	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001
	CUS	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001
	EG	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001	0.001-0.001

HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 1 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 2 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 3 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 4 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 5 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 6 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 7 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 8 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 9 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 10 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 11 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 12 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 13 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 14 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 15 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 16 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 17 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 18 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Objetivos

- 1º Determinar cual y cuantitativamente la concentración de hígino, cuscoquina, cocaína y sus metabolitos en la orina de mascadores de hojas de coca del norte de Argentina.
- 2º Comparar con la orina de consumidores de cocaína de España por una técnica UHPLC-MS/MS, Agilent 1290 Infinity detector Agilent 6460 masa triple cuadrupolo, ESI modo positivo.

Consumidores de Cocaína

No.	Código	Forma de uso	Cantidad (mg)	Tipo de hoja	Substancia	Microgramas / mililitro					
						HI	CUS	COC	BEG	MEG	EG
1	20	varias	10-20	grande	no	44.81	0.270	44.44	44.81		
2	40	1 a semana	8	no	+	12.21	0.148	2.88	1.32		
3	20	varias	10-20	grande	no	12.14	1.841	88.21	187.51		
4	2	1 a semana	20	grande	no	+	2.03	0.01	0.32	0.43	
5	20	varias	10-20	grande	no	+	11.42	1.199	24.26	11.49	
6	1	1 a semana	8	no	+	1.24	0.132	4.48	0.79		
7	2	1 a semana	8	grande	no	+	0.87	0.01	0.15	0.24	
8	20	varias	10-20	grande	no	+	1.84	1.234	8.80	2.58	
9	30	varias	5	grande	no	+	12.51	0.51	0.68	1.44	
10	20	varias	50	grande	no	+	7.61	1.056	22.83	3.33	
11	6	varias	10-20	grande	no	+	151.44	171.507	5405.17	2754.07	
12	2	varias	50	grande	no	+	18.47	2.261	851.44	3365.18	
13	10	varias	5	grande	no	+	1.34	0.575	1.88	16.71	
14	10	varias	4	grande	no	+	4.25	0.583	34.10	292.48	
15	30	varias	4	grande	no	+	2.35	11.080	30.04	149.10	
16	30	varias	10-20	grande	no	+	66.60	0.306	163.07	300.91	
17	5	varias	20-25	grande	no	+	8.84	0.362	17.74	19.45	
18	10	varias	20-25	grande	no	+	1.24	0.01	0.71	1.70	
19	10	varias	8	grande	no	+	7.34	1.855	30.00	11.94	
20	10	varias	10	grande	no	+	11.63	0.378	22.44	9.09	
21	10	varias	100	grande	no	+	1.34	0.01	19.42	4.17	
22	5	varias	100	grande	no	+	0.75	0.01	0.43	0.37	

HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 1 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 2 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 3 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 4 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 5 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 6 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 7 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 8 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 9 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 10 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 11 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 12 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 13 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 14 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 15 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 16 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 17 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 18 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 19 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 20 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Medio 21 - DROGA: HI: Hoja de coca; CUS: Cocaína; COC: Cocaína; BEG: Benzoilgonina; MEG: Metabólitos de BEG; EG: Egonina; AENE: Anilina; AENE: Anilina; AENE: Anilina.

Conclusiones

1. HIGGINA Y CUSCOH SON BUENOS MARCADORES PARA DISTINGUIR A LOS INDIVIDUOS QUE MASCAN HOJAS DE COCA DE LOS CONSUMIDORES DE COCAÍNA.
2. LA RELACIÓN DE ELIMINACIÓN DE COC, BEG, MEG Y EG DE LOS MASCADORES QUE NO USAN ALGUNA SUSTANCIA ALCALINA EN EL MASCADO SE PARECE MÁS A LA DE LOS CONSUMIDORES QUE A AQUELLOS MASCADORES QUE USAN SUSTANCIA ALCALINA EN EL MASCADO Y CUYAS ELIMINACIONES POR ORINA SON SUPERIORES A LA DE LOS CONSUMIDORES. POR LO QUE EL MEDIO ALCALINO PODRÍA SER MÁS EFICIENTE PARA LA EXTRACCIÓN DE LOS ALCALOIDES DE LA HOJA DE COCA.
3. LA RELACIÓN EGONINA/COCAÍNA RESULTA SER 6 VECES MAYOR PARA LOS MASCADORES DE HOJA DE COCA QUE PARA LOS CONSUMIDORES, CUANDO SE HACE LA DIFERENCIA ENTRE AQUELLOS QUE USAN UNA SUSTANCIA ALCALINA PARA EL MASCADO LA RELACIÓN AUMENTA PARA LOS PRIMEROS Y ES SIMILAR A LA DE LOS CONSUMIDORES PARA LOS QUE NO USAN SUSTANCIA ALCALINA, PODRÍA DEBERSE A LA TRANSFORMACIÓN DE COCAÍNA, BEG Y MEG EN MEDIO ALCALINO.
4. EL MÉTODO EMPLEADO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS (EXTRACCIÓN LÍQUIDA) RESULTA SER RÁPIDO Y PRESENTANDO EFECTO MATRIZ.
5. EN LA ORINA DE ALGUNOS DE LOS CONSUMIDORES SE DETECTAN OTRAS DROGAS DE ABUSO, ADemás DE COCAÍNA.



Detection of coca alkaloids in coca leaves and urine samples to proof the consumption of natural coca products

Franziska Krumbiegel¹, Eric Zytowski², Sven Hartwig¹, Cristina Rubio³, Fritz Pragst¹

¹Charité - Universitätsmedizin, Institut für Rechtsmedizin, Berlin
²Landesinstitut für gerichtliche und soziale Medizin, Berlin
³Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina

ORINA

Introduction

In most South American countries it is legal to chew coca leaves or drink coca tea. The coca unprocessed coca leaves. In this study the alkaloid content of coca leaves was determined and alkaloids hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) are only found in natural coca products, but not the time course of their concentrations in urine after a single chewing of coca leaves or drinking of manufactured illicit cocaine [1-4]. Therefore, they can be used as consumption markers of coca tea was investigated.

Material and Method

Urine: 50 µl urine were mixed with glucuronidase and incubated. After centrifugation, 50 µl supernatant were separated and diluted. Finally, 5 µl deuterated internal standard mix (ISTD 1 ng/ml) was added. **Coca leaves or coca tea:** Around 50 mg were extracted with 1 ml MeOH for 24 h. For the measurement, a 1:100 dilution was made and 10 µl ISTD were added. One bag of the coca tea (ca. 1 g coca leaves) was steeped for 5 min with 200 ml hot water. 50 µl were diluted and 5 µl ISTD was added. **Analyses:** Eight samples of coca tea or coca leaves and urine from three volunteers, who drank coca tea or chewed coca leaves were analysed for cocaine

(COC), norcocaine (NC), m-hydroxycocaine (m-OH-COC), benzoylcocaine (BE), m-hydroxybenzoylcocaine (m-OH-BE), ecgonine methyl ester (EME), anhydroecgonine methyl ester (AEME), cocaine (CE), cinnamoylcocaine (CIN), cuscohygrine (CUS), hygrine (HYG), and tropacocaine (TRO) by a validated LC-MS/MS method.

For chromatographic separation an Agilent device (Infinity 1290) and a HILIC column (Poroshell 2.1 x 100 mm, 2.7 µm) was used. The detection and quantitation of the analytes were performed with Agilent 6360 Triple Quadrupole MS.



Results and Discussion

The alkaloid content in coca leaves or coca tea from different regions is presented in a boxplot diagram (Figure 1). Most of the expected coca alkaloids were found in a quantifiable amount and the values are comparable with the values in the literature [1-4]. The main alkaloids COC, CUS, EME, CIN and BE clearly dominate whereas AEME, TRO, NC and CE are only seen with a zoom-factor of 20. BE as a hydrolysis product was probably formed during storage or extraction. There are no clear differences between the concentrations of these analytes in the leaves from different regions.

Remarkably, AEME as a common marker for cocaine smoking (e.g. crack) was detected in coca leaves [2].

Figure 2 presents concentration vs. time profiles for different analytes (BE, EME, m-OH-BE and CUS) in urine from three volunteers after drinking one cup of

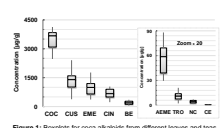


Figure 1: Boxplots for coca alkaloids from different leaves and teas
 coca tea (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

tea drinker (#1 and #2) and after chewing 3-5 g coca leaves with NaHCO₃ for 3 h (#3). In **Figure 2a**, the concentration profile of BE is shown. On the first view, the shape of the curves (#1, #2 tea drinker and #3 coca chewer) is similar, but the big difference are the reached concentrations.

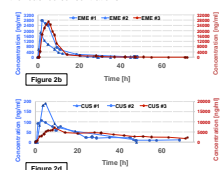


Figure 2: Time-resolved concentrations in urine after drinking 1 cup of coca tea (#1 and #2, blue lines) or chewing coca leaves (#3, red line)

For #3 (coca chewer) the concentration of BE is ten times higher than for tea drinker (#1 and #2). The detection time window was 47-72 h.

In **Figure 2b**, the concentration profile of EME is shown. The concentrations of the coca chewer were ten times higher than the concentrations of the tea drinkers. The detection time window was 47-72 h.

In **Figure 2c**, the concentrations of newer marker are shown. For m-OH-BE and m-OH-COC (not displayed) there were no differences in the analyte concentrations after chewing coca leaves or drinking tea. The detection time window was 18-55 h for m-

OH-BE and 4-42 h for m-OH-COC.

Figure 2d shows the concentration profiles of CUS. The concentrations of the coca chewer were 100 times higher than the concentrations of the tea drinkers. A possible reason could be, that NaHCO₃ as an additive was used while coca chewing resulting in an increased extraction of polar substances. There were notable differences in the detection windows (#1: 46 h, #2: 68 h and #3: > 72 h). The time windows of detection in urine were for COC 4-20 h, AEME 3-7 h and CIN 3-26 h with always higher concentrations for coca chewing.

Conclusion

The detectability of CUS in the urine showed, that it can be used as a consumption marker of natural coca products in forensic toxicology. In the literature it was already shown, that there is no CUS in illicit cocaine preparations [1-4]. A single chewing of coca leaves or drinking of coca tea can be detected by CUS in urine up to 72 hours. In addition, the detection of AEME in urine

samples after coca chewing or coca tea drinking could lead to false positive conclusions due to the fact, that AEME is normally used to proof the smoking of illicit cocaine preparations. Therefore, in South American countries, the detection of AEME is no unambiguous proof of coca smoking.

Table 1: Maximum concentrations (C_{max}) and detection times (t_{det}) of several analytes in urine from tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Analyte	Tea drinker #1 female, 33 yrs	Tea drinker #2 male, 33 yrs	Coca chewer #3 female, 59 yrs
BE	1191 ng/ml 47.9 h	1835 ng/ml 54.2 h	20407 ng/ml > 72 h
EME	2782 ng/ml 47.9 h	1872 ng/ml 44.7 h	28770 ng/ml > 72 h
m-OH-BE	82.6 ng/ml 18.6 h	25.8 ng/ml 20.5 h	65.25 ng/ml 55.0 h
m-OH-COC	32.3 ng/ml 4.9 h	24.1 ng/ml 6.0 h	106 ng/ml 42.0 h
CUS	191 ng/ml 46.4 h	160 ng/ml 68.3 h	7076 ng/ml > 72 h
COC	15.1 ng/ml 4.8 h	2.24 ng/ml 20.5 h	2758 ng/ml 9.0 h
AEME	1.68 ng/ml 3.5 h	-	11.8 ng/ml 7.0 h
CIN	11.5 ng/ml 3.5 h	23.4 ng/ml 26.7 h	226 ng/ml 14.0 h

Table 1: Maximum concentrations (C_{max}) and detection times (t_{det}) of several analytes in urine from tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

Tea drinker (1 cup of tea) and coca chewer (3-5 g leaves with NaHCO₃ for 3h)

- [1] Ruiz NC, Thomas D, Krumbiegel F and Pragst F. Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse. *Drug Testing and Analysis*. 2017;9: 323-346. doi: 10.1002/dta.1972
- [2] Ruiz NC, Krumbiegel F, Pragst F, Thomas D, Nagel A, Zytowski E, Aengwanit N, Gortler JC, Polakowski N. Discrimination between chewing of

LCMSMS vs GCMS in the detection of cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in the real urine samples of coca leaves chewers after six years storage.(RESUMEN POSTER TIAFT-BIRMIN-GHAM-2019)

Rubio N.C.^{1,2}; Moreda-Piñeiro A.²; Alvarez-Freire I. ³; Bermejo-Barrera P.²; Tabernero M.J. ³; Bermejo A.M.³

¹Toxicology Laboratory. Patagonia. Argentina

²Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela SPAIN

³Instituto de Ciencias Forenses “Luís Concheiro” (INCIFOR), Forensic Toxicology Service, Forensic Sciences Institute, Medicine School, University of Santiago de Compostela, C/ San Francisco s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain.

Introduction: Chewing coca leaves or drink coca tea is a current practice in the Andean world: Bolivia, Perú and Argentina and it seems to be it has grown in different social levels in urban populations in Argentina. Legislation in Argentina allows these practices. Thus, the differentiation between people who chewing coca leaf or drink coca tea from people who consume illegal cocaine is very important in the countries where chewing coca leaf is legal because both of them are positive for cocaine and their metabolites in urine, oral fluid and hair. In the last years, several legal disputes have happened to claim about cocaine positive results in urine are due to consumption coca leaves in the traditional way and not due to illegal use of cocaine. The forensic laboratory is obliged to keep biological samples for a certain period of time in order to re-analysis the samples if it is required by the attorney. The storage periods to which the samples can be subjected in forensic cases are variable since weeks, month even years. Thus, the knowledge of the stability of the coca alkaloids is important in the Judicial process.

Aim: the aim of this work is to evaluate the advantages or disadvantages of using LC-MSMS or GCMS in the analysis of 13 urine samples from frequent chewers of coca leaves that were storage during 6 years at -20C, pH near 5 and NaF 1%. The urine samples were analyzed in the year 2012 by GCMS and 2018 by GCMS and LCMSMS. The alkaloids of coca leaves analyzed were cocaine (COC), methylecgonine (EME), cinnamoylcocaine (trCIN), hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS). The special focus was placed on the detection of HYG, CUS and trCIN because no previous studies have been found over urine samples stored for 6 years. HYG and CUS are proposed as markers of chewing of coca leaves and both of them were positive in the first analysis (year 2012) and trCIN as secondary marker.

Method: A qualitative methods for GCMS and LCMSMS were validated following inter-

national guidelines. The separation technique used was liquid-liquid with MTBE at pH=8, the procedure used was the same in all the analysis. The validation parameters evaluated in GCMS and LCMSMS method were: carryover, interference studies, limit of detection. Also, in LCMSMS have been evaluated the matrix effect (ionization suppression/enhancement). The LOD was established by GCMS and (LCMSMS) at 50 ng/mL (5ng/ml) for COC and trCIN, 100 ng/mL (10 ng/mL) for EME and 200 ng/mL (50ng/mL) for CUS. No interferences were founded in the conditions of the analysis. No was observed Carryover at 500 ng/mL by GCMS and carryover was present at 50ng/mL of COC and EME, at 200 ng/mL of trCIN in LCMSMS, no was detected carryover for CUS at a concentration of 500 ng/mL. The ME has not exceeded +/- 25%.

Results: When compare the GCMS technique in the years 2012 and 2018 HYG was not detectable, and the number of urine samples detectable for trCIN and CUS decreases by 15% and near 40% respectively. The performance in LCMSMS is better than GCMS technique in the detection of COC and trCIN, and only two urine samples were negative to HYG and CUS.

	GCMS(2012)	GCMS(2018)	LCMSMS(2018)
	nd/d (%+)		
COC	2/11 (84,6%)	4/9 (69,2%)	0/13 (100%)
EME	0/13 (100%)	4/9 (69,2%)	1/12 (92,3%)
trCIN	5/8 (61,5%)	7/6 (46,2%)	1/12 (92,3%)
HYG	0/13 (100%)	13/0 (0%)	2/11 (84,6%)
CUS	0/13 (100%)	5/8 (61,5%)	2/11 (84,6%)

nd: not detectable; d: detectable

Conclusion: The literature mentions that the condition of storage of our urine samples: in the freezer -20C, pH acid, and NaF 1% retards the degradation of COC and EME. Also, the use of a more sensitive method with lower of detection limits or when the initial analyte concentration is higher (the urine samples are from frequent coca leaves chewers) is more likely it is that the analyte will be detected in long storage. Despite the satisfactory results in the analysis of the urine samples six years later, we should be cautious at the moment of the interpretation of the Judicial causes about of the legality or illegality of the origin of the cocaine in the urine samples. There are not enough studies yet about the stability of trCIN, HYG, and CUS in urine samples.

Keywords: Hygrine and Cuscohigrine; Chewing coca leaves; Coca alkaloids; Drugs stability.



LCMSMS Vs GCMS

in the detection of cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in real urine samples of coca leaves chewers

AFTER SIX YEARS STORAGE.

Rubio N.C.1,2; Moreda-Piñero A.2; Áluarez-Freire I.3; Bermejo-Barrera P.2; Tabernero-Duque M.J.3; S. Strano-Rossi4; Bermejo A.M.3

¹ Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina. ² Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela Spain. ³ Instituto de Ciencias Forenses "Luis Cancheiro" (INCIFOR) Forensic Toxicology Service, Forensic Sciences Institute, Medicine School, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain. ⁴ Institute of Legal Medicine, Università Cattolica del S. Cuore, Rome, Italy.

INTRODUCTION

The time required for a court decision in Argentina and in Spain is usually long, and the requests for reanalysing forensic samples can be possible. The present work studies the possibility to detect several alkaloids of coca leaves [cocaine (COC), methylecgonine (EME), cinnamoylcocaine (CIN), hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS)] in urine from coca leaves chewers from northeast Argentina. Urine samples were stored and handled (they were freeze/thaw several times) for 6 years. The special focus is over HYG, CUS and trCIN. HYG and CUS are potential markers that were detected in urine of people who chew coca leaf but they were not found in urine from cocaine abusers. trCIN is considered as a secondary marker. Scarce researches have been published about the stability of these compounds.

OBJECTIVE

- 1) The evaluation of the possibility of detecting cocaine COC, EME, CIN HYG, and CUS in 13 urine samples from regular coca leaves chewers that were storage (at -20 °C, pH near 5 and NaF 1%) and handled for 6 years. Urine samples were analysed in 2012 by GCMS and in 2018 by GCMS and LCMSMS.
- 2) The development of a more sensitive method to detect the same analytes by LC-MS/MS, discussing the advantages and disadvantages of regard to GC-MS.

Qualitative GCMS and LCMSMS methods

A) DIAGRAM OF THE URINE SAMPLE EXTRACTION



B) EQUIPMENT

GCMS: Agilent 6890A gas chromatograph (Santa Clara, CA, USA) equipped with an Agilent 5973B mass spectrometer was used. Agilent HP-5MS capillary column (30m x 250 µm i.d., internally coated with the polydimethylsiloxane 0.25 µm film) was the column at 250°C and operated in splitless mode for 2 min and then purged for 2 min. Carrier gas: helium (1.0 mL/min). Oven temperature started at 80 °C for 1 min, then temperature is increased at 25 °C/min rate up to 200 °C, and then again at 15 °C/min up to 275 °C for 15 min. The injection volume was 2 µL. The mass spectrometer was kept at 200 °C, the ion source at 230 °C, and the quadrupole at 150 °C. The mass analyzer was operated by electron impact ionization (E, 70 eV) and in selected GCMS operation mode (m/z from 40 to 150).

LCMSMS: a 1200 Q TRAP LCMSMS system (ABSciex, Concord, Canada) equipped with a Pico 15 (150 mm) binary chromatographic pump (PicoTech, Bristol, UK), LQ-Column (4.6 mm i.d., 150 mm, 5 µm, C18, 130 Å) from Agilent. Column: Isolute C18 (2.1 mm i.d., 150 mm, 5 µm, C18, 130 Å) from Agilent. Chromatographic separation (20 min) was performed at 40 °C, under gradient elution using 20 mM ammonium formate in ultrapure water (pH 4.2) as a mobile phase A, and 0.1% acetic acid in 50% methanol as a mobile phase B. Mobile phase: 50% methanol.

C) VALIDATION PARAMETERS

	GCMS	LCMSMS
Carrier	Carrier	Carrier
Interference studies	Interference studies	Interference studies
Limit of detection (LOD)	Limit of detection (LOD)	Limit of detection (LOD)
		Matrix effect
		10 times was recorded (n = 25)
LIMIT OF DETECTION (LOD) (ng/mL)		
	GCMS	LCMSMS
cocaine	50	5
methylecgonine	100	10
tr-cinnamoylcocaine	50	5
hygrine (*)	n/a	n/a
cuscohygrine	200	50

(*) HYG was not commercially available. It was identified, after infusion of a coca leave

Results

a) GCMS (the year 2012) vs GCMS (the year 2018)

HYG was detected 100% in urine samples by GCMS in the first analysis in the year 2012, while it was not detected in urine samples by GCMS in the year 2018.

The number of urine samples, positive to trCIN and CUS, decreases by 10% and near 40%, respectively.

b) LC-MS/MS (the year 2018) vs GCMS (the year 2012 and 2018)

LCMSMS has been found to give better performance than GC-MS (2018) for all compounds and also for COC and trCIN analysed by GC-MS (2012).

It is remarkable the result, by LCMSMS of HYG in the last analysis of GCMS (2018) (94.6% vs 0% samples positive) and CUS (94.6% vs 66.7% samples positive).

Conclusions

1) The possibility of detecting some alkaloids from coca leaf (COC, EME, trCIN, HYG and CUS) in urine samples after long storage (6 years) could be higher if samples are preserved under the conditions used in our study (-20 °C, 10% NaF, and pH close to 5.0).

2) COC was surprisingly found in the urine after six storage years.

3) The use of a more sensitive method with lower LOD as well as higher initial analyte concentrations in samples (urine samples are from frequent coca leaves chewers) allows reliable detection after long storage periods. LCMSMS should be taken into account as a technique in the case to reanalyse urine samples with a long storage period.

4) Despite the satisfactory results in the analysis of the urine samples after a six years storage period, we should be cautious when using the data for judicial cases about the legitimacy or illegitimacy of the origin of cocaine found in urine samples because of several factors affecting the presence of these substances in urine: frequency of coca leaf chewing or drinking coca leaf consumption, use of alternative substances during chewing, partial degradation and original concentration of alkaloids in the first analysed urine sample.

5) The disadvantage of this work is due to the use of a qualitative method that is unable to establish the extent that the compounds analysed was transformed and how each type of stability contributed to the degradation of the analytes.

USC
UNIVERSITY OF SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.5 GRUPO C: ESTUDIOS REALIZADOS EN PELO.

6.5.1 Estudios del comportamiento de la higrina y cuscohigrina en pelo en una población de mascadores de hoja de coca (frecuentes y ocasionales) y bebedores de té de coca vs una población de consumidores de cocaína de Alemania y de un grupo de consumidores de “PACO” de Argentina en rehabilitación.

El estudio del comportamiento de la higrina y cuscohigrina en pelo, era una consecuencia lógica, siendo una matriz hoy en día ampliamente empleada en causas forenses y propuesta en el mundo laboral y del doping. Los resultados hallados en pelo en mascadores de hojas de coca fueron muy prometedores para establecer el tiempo de consumo de hojas de coca, haciendo el seguimiento de la higrina y cuscohigrina, dos metabolitos de la cuscohigrina serían, además, encontrados.

En el primer trabajo publicado:

Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. (Int. J Legal Med DOI 10.1007/s00414-014-1061-6)



No solo se determinó que el pelo era una matriz apta para comprobar que una persona mascaba hojas de coca con cierta frecuencia, sino que resultó fundamental para corroborar la estructura de la higrina y cuscohigrina y de dos metabolitos de las cuscohigrina, con el empleo de un LC-QTOF-MS. En el *Capítulo 5, sección 5.4.2.3.2*, se dan detalle

de estos resultados.

Para remarcar los datos principales de este trabajo: **(Figura 6-2)**

- Los alcaloides de la hoja de coca espectro (a): cocaína (COC), cinamoilcocaína (CIN), tropococaína (TRO), ecgonina metil éster (EME), higrina (HYG) y cuscohigrina (CUS), aparecen en el pelo del mascador CC-06, espectro (c). La benzoilecgonina es un metabolito de la cocaína originado en el organismo, pero que se forma también por hidrólisis química en medio alcalino (in-vitro), su detección en el extracto de la hoja de coca es posible se deba a un proceso de degradación de la cocaína en la hoja o durante el procesamiento. En el pelo del mascador proviene del metabolismo de la cocaína.

- Cocaetileno (CE), norcocaína (NC) al igual que la benzoilecgonina (BE) son metabolitos de la cocaína, cromatograma (c). Cocaetileno se forma por el consumo de la hoja de coca con alcohol, es esperable su hallazgo, porque el mascado de hojas de coca si bien puede hacerse en cualquier momento del día, se da por lo general durante la sobremesa luego del almuerzo o cena, en donde el consumo de alcohol (vino) en la comida, sumado a las largas sobremesas seguidas de la siesta son típicas de las provincias en Argentina.

- Uno de los metabolitos de la cuscohigrina (CUS-M2) se descubrió accidentalmente, tiene las mismas transiciones que la cuscohigrina. Esto fue discutido en el **Capítulo 5, sección 5.4.2.3.2.3.**

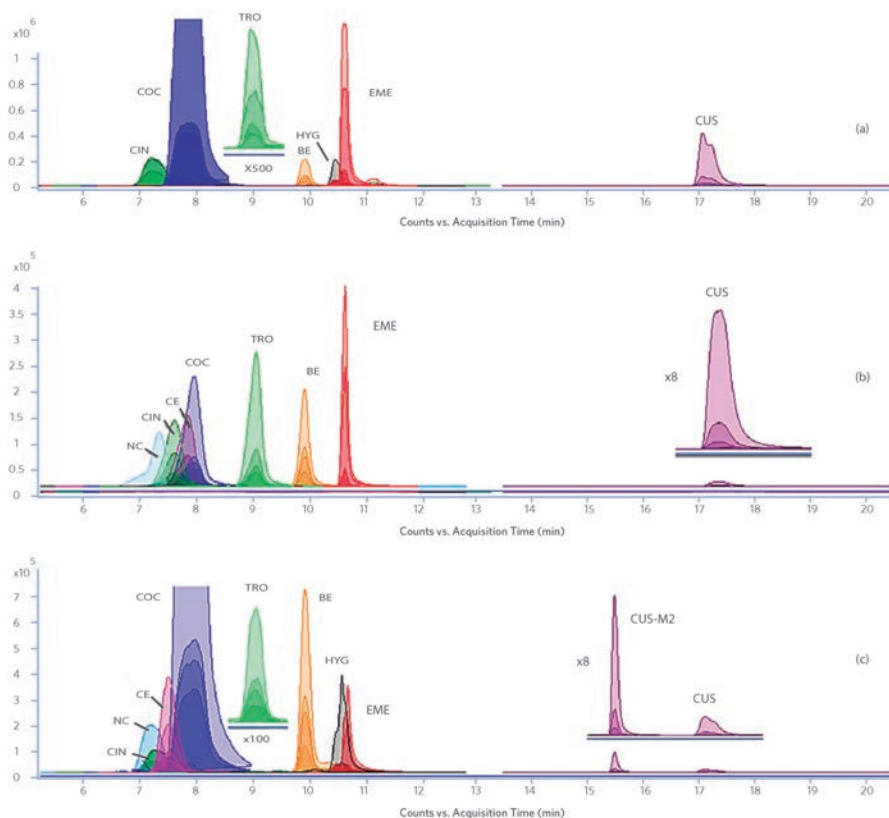


Figura 6-2: Cromatograma HILIC-MSMS. a) Extracto de hoja de coca; b) Mezcla de sustancias de referencias; c) Extracto de pelo del mascador CC-06.

En la **Figura 6-3** se muestran, a modo de ejemplo, dos cromatogramas: (a) pertenece al extracto de pelo de un mascador de hojas de coca (CC-19) y (b) extracto de pelo de un consumidor de cocaína de Alemania (CU-17) en donde claramente se observan las diferencias marcadas con un círculo rojo sobre el cromatograma. Higrina (HYG), cuscohigrina (CUS) y los metabolitos de la cuscohigrina (CUS-M1 y CUS-M2) solo son detectados en el extracto de pelo del mascador de hojas de coca.

La cinamoilcocaína es un alcaloide de la hoja de coca, como ya discutimos en el **Capítulo 5. sección 5.3.5.4**, es un contaminante de la

cocaína y no siempre es eliminado en el proceso de producción ilícita de cocaína, por lo que algunos alijos o muestras de calle pueden contener cinamoilcocaína. La concentración de cinamoilcocaína en los consumidores de cocaína es significativamente menor que en los mascadores de hoja de coca y es un parámetro más que se propone para hacer la

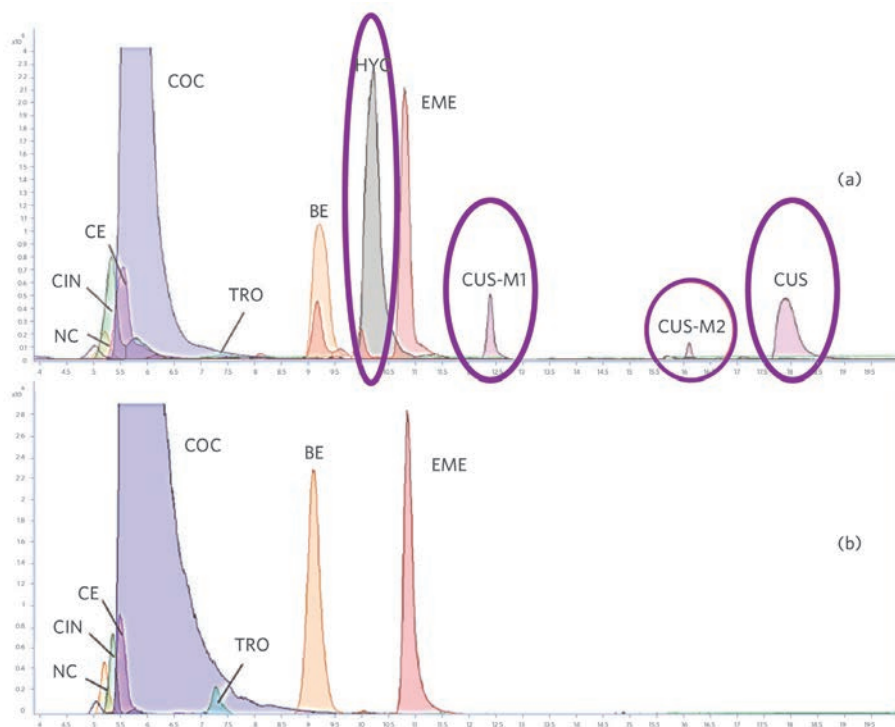


Figura 6-3: Cromatograma HILIC-QTOF-MS. a) extracto de pelo de un mascador de hojas de coca (CC-19) b) consumidor de cocaína de Alemania (CU-17).

El análisis estadístico de la relación CIN/COC; TRO/COC; HYG/COC; CUS/COC; NC/COC; BE/COC; EME/COC y CE/COC muestra diferencias significativas entre los mascadores de hojas de coca y consumidores de cocaína para todas las relaciones con excepción de TRO/COC. Si bien las mayores diferencias se dan para las relaciones: HYG/COC; CUS/COC, EME/COC y CIN/COC. **(Figura 6-4)**

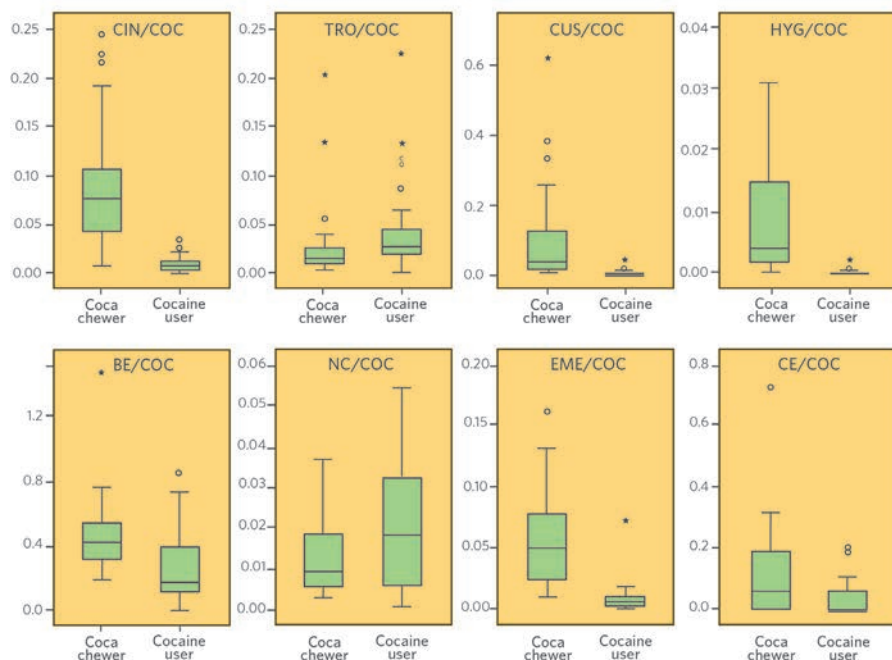


Figura 6-4: Gráficos de Box and Whisker de la relación de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína a cocaína en el pelo de mascaradores de hoja de coca (26) y consumidores de cocaína de Alemania (26).

Como describiéramos en el GRUPO A de trabajos, la higrina y cuscohigrina es eliminada en alto porcentaje en los primeros pasos de la producción ilegal del clorhidrato de cocaína. Una cantidad residual queda en el producto final que es consumido en las calles y que llega a los países europeos; siendo el pelo una matriz que va acumulando la droga ingerida a lo largo del pelo, es lógico que algunos de los consumidores alemanes (o de otras regiones) analizados tuvieran higrina y cuscohigrina en cantidades muy bajas. No fue detectado en los consumidores de Alemania ninguno de los dos metabolitos de la cuscohigrina (CUS-M1 o CUS-M2) seguramente su muy baja concentración hace que no fueran detectados.

6.5.2 Criterios de discriminación o diferenciación propuestos para diferenciar un mascador de consumo frecuente de hojas de coca de un consumidor de cocaína a través del análisis de pelo.

Al detectarse la higrina y cuscohigrina en los consumidores de cocaína, aunque en cantidades residuales, como así también de cinamoil-cocaína, se propone emplear una **combinación de criterios de discriminación** para determinar que estamos en presencia de un mascador de hojas de coca:

$$\text{CIN/COC} > 0,02$$

$$\text{CUS/COC} > 0,01$$

$$\text{EME/COC} > 0,015$$

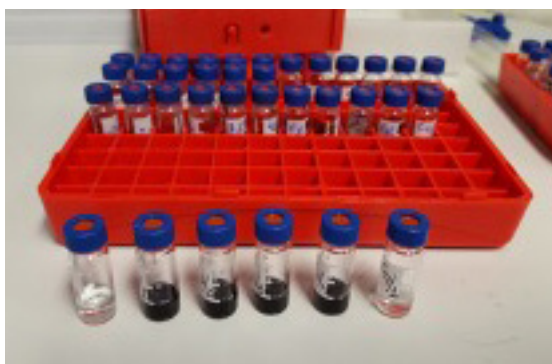
HYG/COC (falta determinar el rango, no se dispone del testigo de higrina)

La presencia de los metabolitos CUS-M1 y CUS-M2.

Además, el análisis de agentes de corte y/o adulterantes es otro criterio a investigar, por ejemplo, la presencia de levamisol o lido-caína.

Un importante requisito para el empleo de estos criterios es que la hidrólisis de la cocaína durante el tratamiento de la muestra de pelo sea excluida.

6.5.3. La utilidad del pelo para diferenciar individuos que ocasionalmente mascan hojas de coca o beben té de coca vs consumidores de cocaína.



El siguiente trabajo que se realizó sobre pelo trató de responder alguno interrogantes que se fueron presentando:

Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of “paco”(coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitation.

Una de las características de la población analizada previamente, de mascadores de hojas de coca, es su alta frecuencia de mascado (varias veces al día) y los años de mascado (2 años a 44 años). Pero existe otra población de mascadores que lo hace aleatoriamente, con una frecuencia de 1 o 2 veces por semana, o alguna vez por mes o bien que toman té de coca no regularmente. **¿cómo sería en estas poblaciones las concentraciones en el pelo? Y si los criterios previamente propuestos de identificación podrían ser útiles en estos casos, ¿podría la higrina y cuscohigrina alcanzar suficiente concentración para poder seguir siendo un marcador distintivo del consumo legal?**



	Cocaína	Benzoilecgonina	Cuscohigrina	Higrina	Cinamoilcocaína	Ecgoninametil éster												
	(ng/mg de peso) (rango)	(ng/mg de peso) (rango)	(ng/mg de peso) (rango)	(Área higrina/Área cocaína-3) (rango)	(ng/mg de peso)	(ng/mg de peso)												
	13,025	0,015-0,022	35,118	3,830	n.d.	29,647	0,203	0,032	327,192	n.d.	1,776	0,484	n.d.	0,069	1,370	n.d.	0,324	
	0,313	0,010-0,025	23,864	0,165	n.d.	11,322	0,074	n.d.	0,008	3,656	n.d.	3,713	0,016	n.d.	0,087	0,018	n.d.	0,261
	0,266	0,030	30,237	0,145	n.d.	19,525	0,028	n.d.	0,007	5,143	n.d.	2,244	0,020	n.d.	0,285	0,022	n.d.	0,142
	4,291	0,300	10,546	1,491	0,27	4,437	0,176	n.d.	0,016	87,517	n.d.	3,170	0,176	n.d.	0,139	0,307	0,02	0,099
	0,085	2,02	2,051	0,046	0,04	1,490	0,032	n.d.	0,013	1,974	Pes.	0,558	0,005	n.d.	0,013	0,014	0,23	0,014
	50,046	1,36-1,83	9,700	19,508	0,30-0,37	3,935	1,177	Pes.-0,1	0,075	483,618	Pes.	0,585	4,738	Pes.-0,1	0,645	2,492	0,03-0,11	0,046
	10,020	0,01-0,07	11,934	4,620	n.d.-0,02	4,380	0,051	n.d.-Pes.	0,025	73,485	n.d.-Pes.	0,299	0,165	n.d.-Pes.	0,139	0,846	n.d.-0,01	0,089
	34,286	0,61	9,230	10,688	0,08	4,310	0,227	0,13	0,025	139,082	Pes.	0,134	0,521	0,13	0,140	0,872	0,84	0,069
	27,818	0,039	3,864	5,265	n.d.	2,041	0,104	n.d.	0,016	29,198	n.d.	0,046	2,673	n.d.	0,133	0,294	n.d.	0,039
	9,790	0,051	5,825	2,762	n.d.	1,911	0,350	n.d.	0,016	321,151	n.d.	0,572	0,391	n.d.	0,058	0,439	n.d.	0,043
	60,100	2,02	4,849	17,823	0,04	1,553	1,694	n.d.	0,047	138,542	Pes.	0,184	11,421	n.d.	0,044	0,828	0,23	0,031
	18,458	1,36-1,83	5,319	7,627	0,30-0,37	1,447	0,270	Pes.-0,1	0,180	135,992	Pes.	0,000	1,920	Pes.-0,1	0,053	0,726	0,03-0,11	0,024
	15,400	0,01-0,07	6,551	6,400	n.d.-0,02	1,355	0,161	n.d.-Pes.	0,017	103,686	n.a.-Pes.	0,000	0,120	n.d.-Pes.	0,080	1,684	n.d.-0,01	0,040
	15,514	0,61	20,282	5,019	0,09	6,652	0,926	0,13	0,040	95,927	Pes.	0,922	0,787	0,33	0,456	0,344	0,04	0,173
	4,531	26,852	1,246	4,884	0,034	n.d.	0,015	24,470	0,015	146,222	n.d.	1,220	1,579	n.d.	0,066	0,736	0,016	0,102
	12,258	7,361	5,885	0,442	0,070	n.d.	0,016	146,222	0,016	146,222	n.d.	1,220	1,579	n.d.	0,066	0,736	0,016	0,102
	43,819	2,884	13,211	1,865	1,853	0,028	64,240	0,028	0,031	236,268	n.d.	5,297	9,426	n.d.	0,005	0,425	0,215	0,015
	42,926	2,016	32,010	0,455	1,397	0,031	236,268	0,031	0,031	236,268	n.d.	5,297	9,426	n.d.	0,005	0,425	0,215	0,015
	19,099	2,230	7,282	0,341	3,150	0,032	204,825	0,032	0,032	204,825	n.d.	1,331	0,009	0,768	0,032	0,009	0,768	0,032
	18,764	4,530	14,176	0,038	0,032	0,007	27,833	1,383	0,007	27,833	1,383	0,007	27,833	1,383	0,007	27,833	1,383	0,007
	1,389	1,082	2,024	0,088	0,348	nd	21,208	0,063	0,063	0,104	0,011	nd	0,034	0,011	nd	0,034	0,011	0,011
	52,379	1,839	22,039	0,257	1,345	0,004	190,536	3,941	5,049	0,004	1,345	0,004	1,345	0,004	1,345	0,004	1,345	0,004
	12,227	3,167	3,938	0,328	0,768	0,006	171,646	1,413	0,607	0,006	171,646	1,413	0,607	0,009	0,597	0,012	0,009	0,597
	2,771	2,705	1,229	0,442	0,263	0,005	127,663	9,811	0,120	0,005	127,663	9,811	0,120	0,003	0,359	0,005	0,359	0,005
	32,473	11,508	20,000	1,307	4,392	0,009	85,053	3,487	3,457	0,009	85,053	3,487	3,457	0,102	0,774	0,043	0,102	0,774
	39,758	12,792	25,862	1,707	24,464	0,032	417,648	4,003	9,654	0,032	417,648	4,003	9,654	0,027	0,800	0,027	0,800	0,027
	75,541	33,530	36,537	5,002	24,779	0,012	219,493	12,838	16,753	0,012	219,493	12,838	16,753	0,114	4,509	0,479	0,114	4,509
	19,086	34,383	8,971	5,839	0,441	0,011	90,799	8,055	0,914	0,011	90,799	8,055	0,914	0,197	0,481	0,358	0,197	0,481
		38,723		4,837	0,010	0,010		0,210	0,202	0,010		0,210	0,202	0,010	0,262	0,262	0,010	0,262
		21,826		2,369		0,011		0,447	0,114	0,011		0,447	0,114	0,011	0,194	0,331	0,011	0,194
		1,500		0,330		0,003		4,487	0,020	0,003		4,487	0,020	0,003	0,020	0,019	0,003	0,019
		4,545		0,515		0,004		19,537	0,007	0,004		19,537	0,007	0,004	0,031	0,007	0,004	0,031
		0,368		nd		0,007		2,417	0,004	0,007		2,417	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004	0,002
		1,011		nd		0,005		1,384	0,005	0,005		1,384	0,005	0,005	0,012	0,005	0,005	0,012
		6,037		0,810		0,004		3,483	0,021	0,004		3,483	0,021	0,004	0,321	0,312	0,021	0,312
		14,602		1,304		0,014		0,954	0,354	0,014		0,954	0,354	0,014	0,354	0,057	0,354	0,057
Mínimo	0,085	0,010	0,388	0,046	nd	1,974	nd	1,974	nd	0,016	nd	0,016	nd	0,016	nd	0,016	nd	0,002
Máximo	75,54	2,02	38,723	36,537	0,64	29,647	24,72	0,13	0,075	463,618	Pes.	19,537	16,753	0,13	0,456	5,597	0,11	0,479

Mascadores frecuentes de hoja de coca.
Mascadores ocasionales de hoja de coca o tomadores de 16 de coca.
Consumidores de cocaína (Alemania).

Mascadores frecuentes de hoja de coca.
Mascadores ocasionales de hoja de coca o tomadores de té de coca.
Consumidores de cocaína (Alemania).

Tabla 6-8: Comparación de la concentración de cocaína, benzoilecgonina, cuscohigrina, higrina, cinamoilcocaína y ecgoninametil éster en las muestras de: mascadores de hojas de coca frecuentes, mascadores de hoja de coca o tomadores de té de coca ocasionales y consumidores de cocaína.

En la **Tabla 6-8** se muestran los resultados en pelo de los alcaloides de la hoja de coca (cocaína, higrina, cuscohigrina, cinamoilcocaína y ecgoninametil éster) y de los metabolitos de la cocaína (benzoilecgonina y ecgoninametil éster) obtenidos de la población de **mascadores de hoja de coca frecuentes** (varias veces al día y durante años) (Int.J.Legal Med. 2014) **mascadores de hoja de coca ocasionales o tomadores de té** (algunas veces en el mes o en el año) (FSI_297_2019), y una población de **consumidores de cocaína** de Alemania. (Int.J.Legal Med. 2014).

De la **Tabla 6-8** podemos concluir:

- Un mascador de hojas de coca y un consumidor de cocaína son imposibles de distinguir solo con el análisis de cocaína y sus metabolitos benzoilecgonina o ecgoninametil éster, si bien podemos esperar una mayor concentración en pelo en los mascadores de hoja de coca de ecgoninametil éster (no solo proviene del metabolismo de la cocaína sino es un alcaloide de la hoja de coca), la diferencia no es tan notoria y hay concentraciones que se superponen. Por lo tanto, necesitamos para afirmar que un individuo es un mascador de hojas de coca (frecuente) analizar en el pelo los otros alcaloides higrina, cuscohigrina y cinamoilcocaína y aplicar los criterios preliminares propuestos.

- Un mascador de hojas de coca o bebedor de té de coca de forma ocasional, tiene una concentración de cocaína en pelo baja (0,01-2,02 ng/mg de pelo), y en algunos casos sus metabolitos no son detectados (benzoilecgonina y ecgoninametil éster), como así tampoco los otros alcaloides de la hoja de coca como higrina, cuscohigrina o cinamoilcocaína, por lo tanto:

- La matriz pelo no resulta útil para hacer la diferenciación de mascadores de hoja de coca o tomadores de té de coca vs consumidores de cocaína si el uso de las hojas de coca no se hace en forma frecuente o rutinaria; por lo que legalmente no puede descartarse el reclamo del acusado que alega una costumbre del uso de hojas de coca, pero si se puede corroborar si afirma un uso continuado de las mismas.

- Las bajas concentraciones de cocaína e incluso la imposibilidad de detectar sus metabolitos en consumidores ocasionales de hoja de coca (mascado de hojas de coca o bebedor de té de coca) pueden crear la

duda al laboratorio sobre la posibilidad de que estemos ante una contaminación del pelo.

6.5.4 Análisis del pelo de una población de adictos en tratamiento ambulatorio de la Argentina que fuman pasta base o pasta de coca o “PACO”. Utilidad de la anhidroecgonina metil éster (AEME) en los fumadores de PACO en Argentina.

Existe en Latinoamérica en los países que producen pasta de coca, un consumo de pasta base que se hace fumado, la cocaína base es volátil, llega al sistema nervioso central muy rápidamente y el efecto es prácticamente inmediato, detalles de la obtención de pasta base y coca base fueron descritos en el *Capítulo 4, sección 4.5*. La anhidroecgonina metil éster (AEME) es un compuesto que se produce por pirólisis durante el fumado de la pasta base o cocaína base y es considerado un marcador del fumado de cocaína (pasta base, crack) pero también un constituyente de la hoja de coca, **¿seguiría siendo la AEME un marcador útil en el caso de existir un mascado de hojas de coca conjuntamente con un consumo ilícito de cocaína fumada?, ¿serán los fumadores de pasta de coca o de “PACO” como se los llama en Argentina, posibles de diferenciar del mascador de hojas de coca a través del análisis de pelo empleando los criterios anteriormente propuestos?.**

El pelo de un grupo de adictos bajo tratamiento ambulatorio que manifestaron ser fumadores de pasta base en recuperación de la ciudad de Buenos Aires fue analizado y sus resultados publicados en la revista *Forensic Science International* 297 (2019) 171-176. La forma de consumo y el tiempo es una información aportada por el adicto y su credibilidad no puede ser confirmada.

Muestra	Edad/Género	Color pelo	Segmento	COC	BE	EME	NC	CE	AEME	CUS	CIN	TRO	HIG*
			(cm)	ng/mg de pelo									
F 1/1	18/f	marrón	0-6	2,27	0,98	0,05	0,09	0,03	0,08	nd	0,22	nd	nd
F 1/2			6-12	4,50	2,08	0,03	0,04	0,02	0,14	nd	0,24	nd	nd
F 1/3			12-18	5,62	2,25	0,03	0,03	0,01	0,17	nd	0,25	nd	nd
F 1/4			18-24	5,78	2,24	0,04	0,03	0,01	0,14	nd	0,30	nd	nd
F 2/1	29/f	marrón	0-6	91,98	14,14	1,07	1,12	6,11	0,60	nd	3,97	nd	nd
F 2/2			6-12	96,28	15,83	0,70	0,55	2,46	0,70	nd	4,95	nd	nd
F 3/1	29/f	negro	0-6	66,63	19,41	4,33	2,97	2,05	1,78	nd	10,64	nd	nd
F 3/2			6-12	71,90	34,72	3,98	1,07	0,74	1,96	nd	7,75	nd	nd
F 3/3			12-18	59,20	34,45	3,65	0,41	0,24	1,77	nd	5,39	nd	nd
F 3/4			18-24	57,54	32,30	2,91	0,36	0,17	1,58	nd	6,27	nd	nd
F 4/1	30/f	marrón	0-9	7,80	4,46	0,14	0,67	0,09	0,32	nd	0,93	nd	nd
F 4/2			9-18	9,47	8,47	0,20	0,14	0,03	0,36	nd	0,62	nd	nd
F 5/1	35/f	rubio	0-6	0,08	0,08	nd	0,01	0,01	nd	nd	nd	nd	nd
F 5/2			6-12	0,12	0,12	0,01	0,01	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F 5/3			12-18	0,03	0,05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F 5/4			18-24	0,03	0,02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F 6/1	36/f	marrón	0-9	3,73	1,14	0,07	0,08	0,45	0,06	nd	0,47	nd	nd
F 6/2			9-18	7,97	2,08	0,32	0,04	0,10	0,11	nd	0,56	nd	nd
F 7/1	37/f	marrón	0-8	43,76	10,42	3,21	3,16	0,38	1,36	nd	3,15	nd	nd
F 7/2			8-16	65,84	23,64	2,38	3,58	0,35	4,15	nd	4,99	nd	nd
F 8/1	38/f	negro	0-6	0,08	0,02	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
F 8/2			6-12	0,42	0,08	0,01	0,01	nd	nd	nd	0,05	nd	nd
F 8/3			12-30	0,08	0,02	nd	nd	nd	nd	nd	0,01	nd	nd
F 9/1	44/f	marrón	0-6	52,14	8,82	0,43	0,56	0,72	0,55	nd	2,61	nd	0,00025
F 9/2			6-12	32,57	9,96	0,35	0,28	0,42	0,44	nd	1,12	nd	nd
F 9/3			12-18	18,67	2,89	0,23	0,06	0,07	0,16	nd	1,22	nd	nd
F 10	21/m	negro	0-3	14,63	2,65	1,26	0,82	0,18	nd	nd	2,76	nd	0,0017
F 11	28/m	marrón	0-2,5	51,31	5,86	1,92	0,70	0,90	0,42	nd	1,68	nd	0,0012
F 12	29/m	negro	0-2,5	1,72	0,36	0,15	0,04	0,06	nd	nd	nd	nd	nd
F 13	30/m	marrón	0-7	168,75	39,32	12,66	4,56	4,68	5,15	nd	6,17	nd	0,0002
F 14	30/m	marrón	0-3,5	4,28	0,53	0,18	0,07	0,10	nd	nd	0,17	nd	0,0049
F 15	30/m	marrón	0-4,5	23,69	5,19	0,67	0,76	0,47	nd	nd	0,86	nd	nd
F 16	31/m	negro	0-5	30,59	3,68	1,99	1,24	1,98	0,38	nd	1,16	nd	0,00039
F 17	35/m	marrón	0-5,5	2,67	0,23	0,02	0,02	0,11	nd	nd	0,10	nd	0,00330
F 18	36/m	marrón	0-2	4,60	0,32	0,08	0,02	0,07	nd	nd	0,16	nd	nd
F 19	37/m	marrón	0-3	340,71	69,22	6,75	5,74	1,69	10,11	nd	45,08	nd	nd
F 21	46/m	marrón	0-8	19,55	8,30	0,38	0,72	0,01	0,76	nd	0,96	nd	0,00035
Rango de calibración				nd: no detectable									
AEME, CUS, TRO: 0.1 - 30 ng/mg				* relación área HIG/COC									
COC, BE, EME, CIN, CE: 0.01 - 30 ng/mg													

Tabla 6-9: Concentración en pelo de alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína de fumadores de pasta base.

En la **Tabla 6-9** se muestran los resultados en pelo de la cocaína (COC), benzoilecgonina (BE), ecgoninametil éster (EME), norcocaína (NC), cocaetileno (CE), anhidroecgonina metil éster (AEME), cuscohigrina (CUS), cinamoilcocaína, (CIN), tropococaína (TRO) e higrina (HIG) y se deduce:

Los alcaloides de la hoja de coca higrina y cuscohigrina no fueron detectados en esta población de adictos (muchos de los cuales podrían

ser fumadores de pasta base según lo reportado por éstos), lo que comprobaría que en fumadores de pasta base (PACO) seguirían siendo de utilidad para diferenciar mascadores de hoja de coca de consumidores ilegales de cocaína. El “PACO” es pasta base, residuo de los primeros pasos de la producción ilegal del clorhidrato de cocaína.

- ❖ No tenemos información del comportamiento de la higrina y cuscohigrina cuando se fuma.

- ❖ Anhidroecgonina metil éster (AEME) es considerado un marcador de fumado de coca base o “crack” (de mayor pureza), es un producto que se forma por pirólisis al fumar pasta base, también como artefacto en cromatografía gaseosa **y fue hallado en las hojas de coca y en té de coca**. Su utilidad como marcador de fumado debe ser estudiada en el caso de mascadores de hoja de coca habituales, los resultados obtenidos no son suficientes para sacar una conclusión.

- ❖ Del análisis de la concentración de la cocaína/benzoilecgonina de los segmentos de pelo de la población femenina (por su longitud permitió que se analizaran segmentos de pelo) se ve el bajo seguimiento del tratamiento de alguno de los pacientes (ambulatorios) y la utilidad del pelo para estos casos para corroborar los dichos del paciente. En la muestra de pelo de color rubio la concentración de los compuestos medidos es baja como es de esperar por el bajo contenido de melanina o bien consecuencia además de un bajo consumo.

6.5.5 Cambios en la distribución de alcaloides de la coca en el pelo de mascadores de hoja de coca frecuentes, por el empleo de sustancias alcalinas en el mascado.

En el póster: *Can the use of alkaline substance during chewing coca leaves change the distribution of alkaloids of cocaine in hair?* presentado en TIAFT 52 Annual Meeting of the international Association of Forensic Toxicologists-Buenos Aires 9-13 noviembre de 2014, se mostraron los resultados preliminares de este tema.

Como ya explicamos en el punto **6-4-3 del Grupo B (análisis de muestras de orina)**, el empleo de sustancias alcalinas durante el mascado, mejora la extracción de los alcaloides y en consecuencia es espe-

table un mayor ingreso de estos a través de la mucosa oral, además, el estado no ionizado de los alcaloides en medio alcalino favorece su absorción. Los más lipofílicos como la cocaína y cinamoilcocaína son los que tendrán mayor eficiencia de ingreso al organismo (entre 15 a 32 veces más si hacemos relación entre las medias) vs los más hidrofílicos como la cuscohigrina y ecgonina metil éster (entre 6 a 7 veces).

Como se observa en el poster presentado en la TIAFT-2014 en Buenos Aires, se halló una diferencia significativa en la concentración en pelo entre mascadores de coca frecuentes con y sin el empleo de sustancias alcalinas en: la cocaína, ecgonina metil éster, cinamoilcocaína, benzoilecgonina, tropococaína, norcocaína, cocaetileno. No hallándose diferencia entre la cucohigrina y la higrina.



Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios

Nelida Cristina Rubio · Martin Hastedt ·
Jorge Gonzalez · Fritz Pragst

Received: 13 March 2014 / Accepted: 31 July 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Contrary to the illegal use of any form of manufactured cocaine, chewing of coca leaves and drinking of coca tea are allowed and are very common and socially integrated in several South American countries. Because of this different legal state, an analytical method for discrimination between use of coca leaves and abuse of processed cocaine preparations is required. In this study, the applicability of hair analysis for this purpose was examined. Hair samples from 26 Argentinean coca chewers and 22 German cocaine users were analysed for cocaine (COC), norcocaine (NC), benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME), cocaethylene (CE), cinnamoylcocaine (CIN), tropacocaine (TRO), cuscohygrine (CUS) and hygrine (HYG) by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in combination with triplequad mass spectrometry (MS/MS) and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QTOF-MS). The following concentrations (range, median, ng/mg) were determined in hair of the coca chewers: COC 0.085–75.5, 17.0; NC 0.03–1.15, 0.12; BE 0.046–35.5, 6.1; EME 0.014–6.0, 0.66; CE 0.00–13.8, 0.38; CIN 0.005–16.8, 0.79; TRO 0.02–0.16, 0.023; CUS 0.026–26.7, 0.31. In lack of a reference substance, only qualitative data were obtained for HYG, and two metabolites of CUS were detected which were not found in hair of the cocaine users. For interpretation, the concentrations of the metabolites and of the coca alkaloids in relation to cocaine were statistically compared between coca chewers and cocaine users. By analysis of variance (ANOVA)

significant differences were found for all analytes ($\alpha=0.000$ to 0.030) with the exception of TRO ($\alpha=0.218$). The ratios CUS/COC, CIN/COC and EME/COC appeared to be the most suitable criteria for discrimination between both groups with the means and medians 5-fold to 10-fold higher for coca chewers and a low overlap of the ranges between both groups. The same was qualitatively found for HYG. However, these criteria cannot exclude cocaine use in addition to coca chewing. In this regard screening for typical cutting agents can be helpful and led to the detection of levamisole (21×), lidocaine (6×) and paracetamol (3×) in the 22 samples from German cocaine users, whereas no levamisole, lidocaine (3×) and paracetamol (1×) were found in hair from the Argentinean coca chewers. These criteria have to be confirmed for South American cocaine consumers including smokers of coca paste and may be different because of different composition of the drug and other use habits.

Keywords Coca chewer · Cocaine · Coca alkaloids · Cuscohygrine · Hair analysis · Hygrine

Introduction

Chewing coca leaves and drinking coca tea have created a great conflict debate in South American countries where traditional use of coca leaves is established, such as Bolivia, Peru, Chile and Argentina. The history of coca leaf chewing developed in different steps from the sacred leaf to a substance liable for abuse. In 1952 the WHO Expert Committee on Drugs Liable to Produce Addiction concluded that ‘coca chewing... must be defined and treated as an addiction’ and advised this to the Commission on Narcotic Drugs [1]. The 1961 Single Convention on Narcotic Drugs listed the coca leaf

N. C. Rubio · J. Gonzalez
Forensic Toxicology Laboratory, Cipolletti, Patagonia, Argentina

M. Hastedt · F. Pragst (✉)
Institute of Legal Medicine, University Medicine Charité,
Turnstrasse 21, 10559 Berlin, Germany
e-mail: fritz.pragst@charite.de

as 'a substance liable for abuse' in schedule 1, imposed special restrictions on cultivation and stipulated the phasing out of traditional use within 25 years [2]. The 1988 Convention against Illicit Traffic in Narcotic Drugs and Psychotropic Substances ratified the 1961 Convention [3].

On the other hand, the Declaration on the Rights of Indigenous Peoples, adopted by UN (2007), respects the cultural traditions and medicinal practices of all indigenous populations [4]. This recognition reflects a clear contradiction in international law regarding the legal status of traditional use of coca. Presently, in South American countries, cultivation, sale and possession of unprocessed coca leaf products (but not of any extracted form of cocaine) remain generally legal or are at least tolerated. For instance, in Argentina, the federal law allows the coca-chewing habit and the drinking of coca tea [5]. These habits are very common and socially integrated. They are not restricted to native people but are used in all layers of the population and in all professions.

The traditional method of chewing coca leaf, called 'acullico' consists of mixing them with small quantities of an alkaline substance and keeping a saliva-soaked ball of coca leaves in the mouth. The alkaline substance (ashes of the quinoa plant or sodium bicarbonate) softens the leaves and helps in extracting coca alkaloids from the leaves. Such an activity is named differently as *mambear*, *chacchar* or *acullicar* (from Quechua language) or *coquear* (in northern Argentina). A usual daily amount is for instance 50g leaves. Coca tea (mate de coca) is prepared by submerging raw coca leaves (e.g. 1 g per cup) in hot water.

The effects of chewing coca leaves are anaesthetic feeling in the mouth, throat and tongue; mild stimulation (described like coffee) to overcome fatigue and suppression of hunger and thirst. It enhances physical performance at high altitudes and is considered particularly effective against altitude sickness caused by the low oxygen content of the air. The physiological mechanisms of this beneficial effect seem to be complicated and involve the metabolism of sugar and lipids as well as an increase of heart rate and blood pressure [6–9]. Addition from the consumption of the leaf in its natural form has not been documented, and chewing coca is defined as a habit rather than an addictive behaviour. Moreover, coca leaf chewing is reported as a therapy for cocaine maintenance of previous cocaine paste smokers [10]. Adverse effects of coca chewing are bad breath and erosion of the teeth which are possibly caused by alkaline additives and not by coca itself.

Contrary to coca leaves, all different kinds of cocaine preparations (cocaine hydrochloride, free basing, crack and coca paste) are illicit and banned by national laws in all South American countries because of its endangering psychic effects after acute use and because of addictive behaviour with all its negative impacts on personality and disastrous socio-economic consequences of chronic use. This different action and legal state demand an analytical method for

discrimination between the use of coca leaves and abuse of artificial cocaine preparations in all forensic and clinical cases where drug testing for cocaine is performed.

Methods for this purpose should be based on differences between coca leaves and cocaine products in the chemical composition of the alkaloids. The content of alkaloids in coca leaves was qualitatively and quantitatively investigated several times and varies with coca species, age of the plant and the leaf, position in the leaf, soil composition, altitude of cultivation, longitudinal location, environmental factors, the time lapse between leaf harvesting and analysis and the conditions of storage [11–19]. The cocaine content of dried coca leaves is usually 0.4–0.7 % (w/w). The content of the other alkaloids is frequently given as per cent (w/w) relative to cocaine. As an example, in the investigation of samples from fields in Bolivia, Peru, Ecuador and Columbia and from a greenhouse at the US Department of Agriculture by Moore et al. [13], it amounted to 29–63 % ecgonine methyl ester, 0.16–4.9 % tropacocaine, 5.8–53 % *cis*-cinnamoylcocaine, 2.9–170 % *trans*-cinnamoylcocaine, 1.4–24 % hygrine, 3.8–61 % cuscohygrine and 2.5–61 % total of isomeric truxillines. Furthermore, low concentrations of tropinone were described [14, 15]. Benzoyllecgonine (1–2 % related to cocaine in coca tea bags [16]) seems not to be a natural alkaloid in coca leaf but is formed by hydrolysis of cocaine [12].

In the illicit production of cocaine hydrochloride from coca leaves, cocaine is enriched and the relative content of the other alkaloids is decreased [20]. Before distribution to the consumers, adulterants and diluents are frequently added [21].

It was shown in a previous study by GC mass spectrometry (GC-MS) [22] that from these substances, hygrine ((1-methylpyrrolidin-2-yl)propan-2-one) and cuscohygrine (1,3-bis-(1-methylpyrrolidin-2-yl)propan-2-one, chemical structures shown in Fig. 1) in urine samples are suitable markers for recent use of coca leaves since these pyrrolidine alkaloids were detected neither in seized illicit cocaine nor in urine samples from consumers of cocaine. Hygrine and cuscohygrine are side products in the biosynthesis of cocaine from ornithine via the *N*-methyl- Δ^1 -pyrrolinium cation and hygrine- α -carboxylic acid [12]. The concentrations in greenhouse-cultivated and field-cultivated dried coca leaves were 0.06–0.12 % hygrine and 0.17–0.25 % cuscohygrine [17, 18]. In addition, also hygroline and dihydrocuscohygrine were detected with the carbonyl groups hydrogenated to the hydroxyl groups [18].

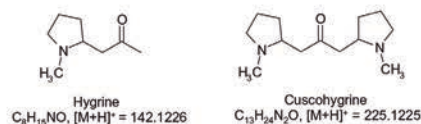


Fig. 1 Chemical structure of hygrine and cuscohygrine

Hair analysis is widely used and accepted as a suitable method for the detection of drug abuse including cocaine and its metabolites [23]. It was also applied to hair of coca chewers by Henderson et al. [24] and Möller et al. [25]. These studies were limited to cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester. In the same way, cocaine and its metabolites were also detected in hair samples from ancient Peruvian and pre-Columbian coca chewers [26, 27].

In the present study, the use of hair analysis for the discrimination between chewing coca leaves and abuse of cocaine preparations was examined. For this purpose, hair samples from 26 coca chewers from the north of Argentina and from 22 German cocaine users were analysed by liquid chromatography–triplequad mass spectrometry (LC-MS/MS) for cocaine (COC) and its metabolites benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME), norcocaine (NC) and cocaethylene (CE) and for the coca alkaloids cinnamoylcocaine (CIN), tropacocaine (TRO), hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS). Furthermore, a screening by LC quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS) for metabolites of these alkaloids and for adulterants and diluents was performed. Particular attention was put on CUS as the most promising marker [22]. However, further evidence was also expected from the concentration ratio of the metabolites and the other alkaloids to COC which should be significantly higher in the case of coca chewers, and from the absence of typical adulterants.

Materials and methods

Chemicals, reagents and reference substances

The solvents and chemicals used for the mobile phase were purchased as follows: methanol (LC-MS grade), acetonitrile (LC-MS grade) and ammonium acetate (HPLC grade) from Fisher Scientific (Schwerte, Germany); ammonium formate (LC-MS grade) from Agilent Technologies and water (HPLC grade) and formic acid (99+% for analysis) from Acros Organics (Geel, Belgium). All other solvents and reagents used for sample preparation were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) in analytical-grade purity.

COC, cocaine-d3 (COC-d3), NC, norcocaine-d3 (NC-d3), BE, benzoylecgonine-d3 (BE-d3), EME, ecgonine methyl ester-d3 (EME-d3), CE, *trans*-cinnamoylcocaine (*trans*-CIN) and TRO were purchased from LGC Promochem (Wesel, Germany). CUS (purity 95 %) was obtained from Toronto Research Chemicals, Inc., (North York, Canada). HYG was not commercially available and was identified only based on its presence in coca leaves by mass spectrum.

Subjects and hair samples

Scalp hair samples from 26 coca chewers CC-01 to CC-26 from the northern part of Argentina were collected at the vertex posterior region as close as possible to the skin. A written informed consent was obtained from each individual, and personal data (age, gender, profession, health state and medical treatment) as well as self-reported data about the coca-chewing habits (years of chewing, frequency per day, type of leaves, amount per ball and basic additives) were accounted during sampling. These data are given in Table 1.

Hair samples from Argentinean cocaine users were not available to the authors at the time of this study. Therefore, for comparison, hair samples from 22 German cocaine users CU-01 to CU-22 with positive results for cocaine in a previous test with forensic background were included in these investigations.

Preparation of coca leaves and hair samples

Coca leaves from northern Argentina were analysed for comparison with respect to further ingredients. The leaves were cut to small pieces, and 50 mg was extracted with 5 ml of a mixture of methanol/acetonitrile/2 mM ammonium formate (25:25:50, v/v/v) for 15 min. After centrifugation, the liquid was separated and purified by microfiltration, 1:100 diluted with the same solvent, and 2 µl was injected for LC-MS/MS or LC-QTOF-MS measurement.

The hair samples of the coca chewers were analysed in full length with the exception of CC-25 which was investigated in three 6-cm-long segments. Also for the German cocaine users, no uniform length was analysed, and nine samples were analysed in two to four segments. The short and varying natural hair length of many of the individuals and the limited sample amounts did not allow analysing a uniform length of the hair segments. The sample preparation was performed according to the method described in a previous paper [28]. The hair was washed with water and acetone for external decontamination, dried and cut to pieces of 1–2-mm length. Between 5 and 35 mg (depending on available sample amount) were exactly weighed in a 1.5-ml Eppendorf vial. After addition of the deuterated standards (5 µl of each 1 ng/µl COC-d3, NC-d3, BE-d3 and EME-d3), the hair was incubated for 18 h with 0.5 ml of a mixture of methanol/acetonitrile/2 mM ammonium formate (25:25:50, v/v/v) with gentle shaking at 37 °C by a thermomixer TMix 220 (Analytik Jena AG, Germany). Then, the mixture was centrifuged, and the liquid phase was separated. The incubation of the hair pieces was repeated for 18 h with another 0.5 ml of the solvent mixture. Both extracts were united and evaporated in a nitrogen stream to a residue of 0.5 ml in order to remove most of the organic solvents. Five microlitres of the residue were injected for LC-

Table 1 Personal data, self-reported coca-chewing habits and hair samples of the coca chewers included in this study

Volunteer no.	Age, gender	Profession	Chewing years	Frequency	Amount (g per chewing)	Leaves	Alkaline substance	Hair length (mm)	Hair colour
CC-01	43, M	Physician	23	Several per day	5 (20-30/day)	Large	Bicarbonate	35	Brown
CC-02	73, F	Retired	44	One per week	5	Large	No	60	Brown
CC-03	18, M	Student	2	One per week	10	Large	No	50	Brown
CC-04	70, F	Retired	10	Several per day	10	Large	No	55	Brown
CC-05	43, F	Biochemist	3	One per week	5	Large	No	210	Brown
CC-06	47, M	Nurse	No data	Several per day	50	Medium	Bicarbonate	15	Black
CC-07	44, M	Employee	No data	Several per day	15	Medium	Yista salada	10	Black
CC-08	43, M	Physician	10	One per week	10	Large	Bicarbonate	70	Brown
CC-09	42, M	Driver	26	Several per day	10	Small/Large	Yista chamabico	20	Black
CC-10	59, M	Locksmith	30	One per day	50	Large	Chamabico stebia	30	Brown
CC-11	60, M	Employee	20	Several per day	50	Large	Chamabico	40	Brown
CC-12	25, M	Sportsman	6	Several per day	60	Large	Bicarbonate	30	Black
CC-13	20, M	Mason	2	Several per day	50	No data	Bicarbonate	10	Black
CC-14	58, M	Electrician	24	Several per day	50	Large	Chamabico	25	Brown
CC-15	27, M	Traffic inspector	10	One per day	5	Large	Bicarbonate	20	Black
CC-16	29, M	Driver	10	One per day	4	Large	Chamabico	30	Black
CC-17	48, M	Electrician	36	One per day	4	Large	No	65	Black
CC-18	58, M	Serene	30	Several per day	5 (20-30/day)	Large	Bicarbonate	50	Black
CC-19	64, M	Technician	5	Several per day	3 (12-18/day)	Large	Benitol	55	Brown
CC-20	29, M	Mason	10	Several per day	7 (28-42/day)	Large	Bicarbonate	15	Black
CC-21	32, M	Painter	16	Several per day	5 (20-30/day)	Small	Bicarbonate	30	Black
CC-22	60, M	Painter	10	One per day	5	Large	Bicarbonate	70	Black
CC-23	53, M	Mechanical	10	One per month	5	Large	No	35	Black
CC-24	37, M	Social worker	10	Several per day	30	Large	No	25	Brown
CC-25	66, F	Retired	12	Several per day	300 per day	Large	Bicarbonate	180	Brown
CC-26	Unknown, M	Driver	No data	Several per day	20 per day	Small/Large	Bica/Yista	35	Black

MS/MS or LC-QTOF-MS measurement without further clean-up.

Liquid chromatography

An HPLC device Agilent 1200SL consisting of a degasser, a thermostated HiP-ALS autosampler, a binary pump Bin Pump SL and a TCC SL column oven was applied for chromatographic separation. It was found that the LC conditions used in the work of Broecker et al. [28] were not suitable in the present study since cuscohygrine and ecgonine methyl ester had very short retention times with large matrix effects. Therefore, a hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) column (Poroshell 120 HILIC, 2.1 × 100 mm, 2.7 µm, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) was used under the following optimised conditions: mobile phase A ammonium formate buffer pH 4.2, mobile phase B acetonitrile, and gradient A/B 7:93 with a flow of 0.300 ml/min for 6 min, changing to 15:85 in 6 min, changing to 40:60 in 3 min, increasing the flow to 0.500 ml/min and holding for 20 min for column

conditioning, then return to 7:93 and 0.300 ml/min for 2 min before the next measurement. The column temperature was 40 °C. The retention times of all substances are shown in Table 2 together with the MS/MS data. These conditions were used both in LC-MS/MS (triplequad) and LC-QTOF-MS measurements. Typical LC-MS/MS chromatograms are shown in Fig. 2 for a coca leaf extract, a mixture of the reference substances and the extract from the hair sample of the coca chewer CC-06.

MS/MS

The quantitative measurements were performed with an MS/MS instrument Agilent 1290 Infinity LC/Agilent 6460 QQQ (Agilent Corporation, Waldbronn, Germany). After optimisation, the following MS/MS conditions were used: Ion source is electrospray ionisation (ESI) in positive mode, nozzle voltage 0 kV, capillary voltage 3,500 V, nitrogen temperature 210 °C, nitrogen flow 10 l/min, sheath gas flow 12 l/min, sheath gas temperature 380 °C and nebulizer pressure 45 psi.

Table 2 Retention times, MS/MS data and validation data of coca alkaloids and cocaine metabolites analysed in the present study

Compound	RT (min)	MRM	ISTD	Frag (V)	CE (V)	CA (V)	Linear range (ng/mg)	R ² weighting factor	LOD (ng/mg)	LLOQ (ng/mg)	Matrix effect (%)
COC	7.5	304.2–182.1 304.2–105.0 304.2–82.0 304.2–77.0	COC-d3	110	16 37 32 61	2 1 1 2	0.005–50	0.9810 1/x	0.02	0.06	–31
COC-d3	7.6	307.1–185.1 307.1–85.1	–	138	17 21	1 2	–	–	–	–	–
NC	6.7	290.1–168.1 290.1–77.1 290.1–68.1 290.1–51.1	NC-d3	116	13 65 37 129	2 2 2 2	0.005–15	0.9787 1/x ²	0.48	1.59	–17
NC-d3	6.8	293.1–171.1 293.1–77.0	–	120	29 60	2 1	–	–	–	–	–
BE	9.8	290.1–168.1 290.1–105.0 290.1–82.1 290.1–77.0	BE-d3	120	17 29 29 60	2 2 3 2	0.005–50	0.9620 1/x	0.02	0.06	–45
BE-d3	9.9	293.1–171.1 293.1–77.0	–	120	17 60	2 1	–	–	–	–	–
EME	10.5	200.1–182.1 200.1–82.1 200.1–67.1 200.1–41.1	EME-d3	126	18 26 66 70	1 2 2 1	0.005–50	0.9926 1/x ²	0.04	0.12	–29
EME-d3	10.6	203.5–185.2 203.5–85.1	–	121	17 25	1 2	–	–	–	–	–
CE	7.8	318.2–196.1 318.2–91.1 318.2–82.1 318.2–77.1	COC-d3	123	17 41 33 60	2 2 2 4	0.005–15	0.9666 1/x ²	0.02	0.06	–48
trans-CIN ^a	7.0	330.2–77.1 330.2–182.1 330.2–103.1 330.2–51.1	COC-d3	136	86 14 54 142	2 3 3 3	0.005–15	0.9232	0.03	0.10	–49
TRO	8.8	246.1–124.1 246.1–77.1 246.1–67.1 246.1–51.1	BE-d3	126	18 58 42 106	3 3 3 3	0.005–5	0.9799 1/x ²	0.50	1.59	–48
CUS	17.0	225.2–84.1 225.2–42.1	EME-d3	68	10 62	2 2	0.005–5	0.9112 1/x	0.97	2.91	+19
CUS-M2	15.5	225.2–84.1 225.2–42.1	–	68	10 62	2 2	–	–	–	–	–
HYG	10.3	142.1–84.1 142.1–42.1	–	164	14 30	1 1	–	–	–	–	–

LC-MS/MS conditions see sections on “Liquid chromatography” and “MS/MS”

RT retention time, MRM multireaction monitoring transition, bold for quantification, ISTD internal standard, Frag fragmentor voltage, CE collision energy, CA cell acceleration voltage, linear range of calibration in ng/mg, LOD limit of detection, LLOQ lower limit of quantification

^aThe calibration curve from trans-CIN was used for cis- and trans-CIN which were not separated under these conditions. See text

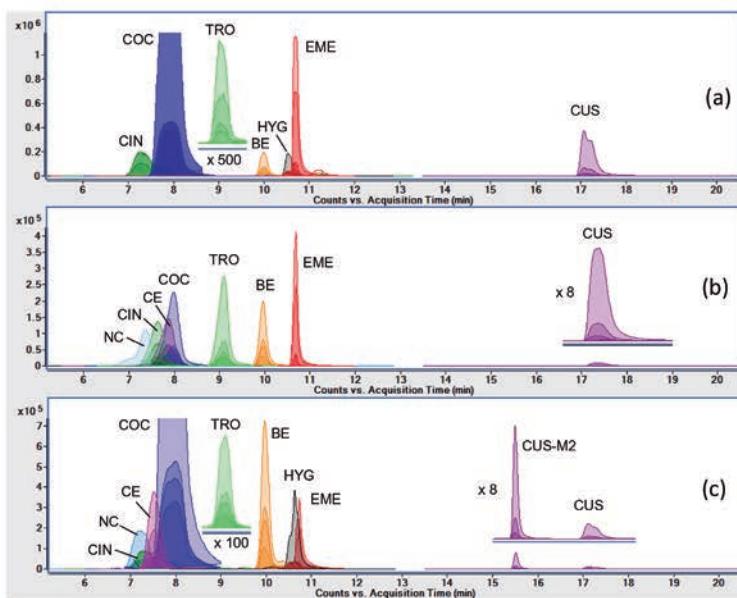


Fig. 2 HILIC-MS/MS chromatograms of **a** an extract of coca leaves, **b** a mixture of the reference substances, injected amount each 300 pg per substance, and **c** the hair extract of the coca chewer CC-06

The samples were run in dynamic multiple reaction monitoring mode (dynamic MRM). The MS parameters used are given in Table 2.

Hybrid QTOF-MS

A 6530 Accurate-Mass QTOF-MS instrument (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) was used in combination with a library of product ion spectra of toxic compounds. The measurement of accurate collision-induced dissociation (CID) spectra was done for a general search of metabolites and other drugs and adulterants in the hair samples. Details about the method and its application for screening in hair were described in previous papers [28, 29]. The QTOF-MS instrument was operated under the following conditions: ion source ESI + Agilent Jet Stream Technology in positive ionisation mode. The source parameters were as follows: gas temperature 320 °C, gas flow 8 l/min, nebulizer pressure 35 psi, sheath gas temperature 380 °C, sheath gas flow 11 l/min, VCap voltage 3,000 V, nozzle voltage 0 V and fragmentor voltage 150 V. The quadrupole was used as an ion guide in MS mode and for the selection of precursor ions with $\Delta m/z=4$ in MS/MS

mode, collision cell without CID in MS mode and with CID of precursor ions in MS/MS mode. The CID energy was mass-dependent ramped (offset 4 eV, slope 6 eV/100 m/z) in measurements using data-dependent acquisition. The TOF-MS was operated with a mass accuracy <3 ppm, mass resolution of 5,000–10,000 (100–922 m/z), a measuring frequency of 10,000 transients per second, a detection frequency of 2 GHz (200,000 points per transient) and a mass range of 100–1,000 m/z in MS mode and 50–600 m/z in MS/MS mode. The scan rate was 3 Hz in MS and MS/MS experiments.

Calibration and validation

In this research project, a basic validation according to Peters et al. and Schmitt et al. [30, 31] was performed which was based on international guidelines and included calibration, determination of linear range and linearity (R^2) and determination of the limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ) as well as of the matrix effects. For quantification, the respective deuterated internal standards were used as far as available. For CUS, CIN and TRO, for which deuterated standards were not available, EME-d3, COC-d3 or BE-d3

was used as an internal standard. Only *trans*-CIN was used as reference substance for calibration of *cis*- and *trans*-CIN which were not separated under these chromatographic conditions. However, using the *trans*-CIN calibration for the mixture of both isomers should not lead to a larger error since it was shown under different chromatographic conditions with separation of both isomers that the transitions 330.2→51.1, 330.2→77.1 and 330.2→103.1 were identical, and only 330.2→182.1 had a different peak area ratio. Since HYG was not available as a reference substance, only relative concentrations were calculated as the peak areas divided by the EME-d3 peak area and the sample weight.

The calibration was performed in duplicate. No interferences were seen in the MRM chromatograms from blank samples at the retention times of the analysed compounds and deuterated standards. Standard solutions of the analytes and 5 ng of the deuterated standards were added to 20 mg drug-free hair and analysed as described in sections on "Preparation of coca leaves and hair samples" to "MS/MS". The linear ranges of the calibration curves, the weighting factors and the product moment correlation coefficients were evaluated. The LODs and LOQs were determined as the signal-to-noise ratio (S/N) of three and of 10. The main validation parameters are also shown in Table 2.

The matrix effects were estimated using the post-extraction spike method at a concentration level of 0.5 ng/mg. All matrix effects were below 50 %, and the internal standards were able to sufficiently correct the matrix effects that were observed.

Statistical evaluations and comparison of hair results

Statistical analysis was performed using SPSS v19.0. Comparison of alkaloid or metabolite to cocaine ratios utilised analysis of variance (ANOVA) to determine whether or not significant differences exist between coca chewers and cocaine users. Significance was attributed to differences that attained a value of α lesser than or equal to 0.05.

Results and discussion

Analytical methods

Two methods were applied in the present study: LC-QTOF-MS and LC-MS/MS. The LC conditions of the validated LC-QTOF-MS method described previously [28] and routinely used for the screening and determination of illegal drugs in hair in the laboratory of the authors appeared not to be favourable for this study since EME, CUS and HYG were not sufficiently retained by the reversed-phase column. Therefore, an HILIC column was chosen, and the mobile phase was optimised for these conditions. HILIC-MS/MS

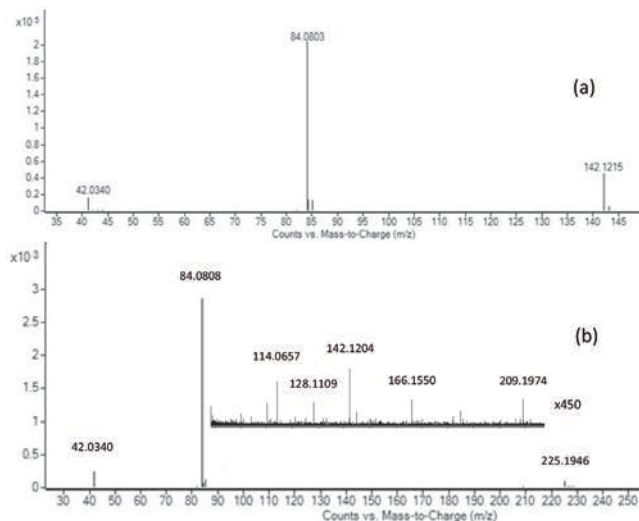
was shown to be suitable for hair analysis of cocaine and metabolites previously by Quintela et al. [32]. The method was basically validated for LC-MS/MS and used for the quantitative measurements because of its higher sensitivity as compared to LC-QTOF-MS. It is shown in chromatograms of a coca leaf extract and of a mixture of the reference substances in Fig. 2 that the substances with the exception of *cis*- and *trans*-CIN are sufficiently separated under these conditions. The calibration curve with *trans*-CIN as a reference substance could be applied to the mixture of both isomers since both isomers showed approximately the same MS/MS behaviour. Retention times and MRM transitions of all analytes and the validation data are given in Table 2. The calibration curves were linear in the investigated concentration range. The method proved to be sufficiently sensitive with LODs between 0.02 and 0.97 pg/mg and LOQs between 0.06 and 2.9 pg/mg. The matrix effects were below 50 % and were sufficiently compensated by the deuterated internal standards. Figure 2c shows a typical chromatogram of a hair sample from a coca chewer.

Search procedures and structural identification by accurate mass fragment spectra of drugs, metabolites and cutting agents were performed with LC-QTOF-MS. The accurate CID mass spectra of HYG and CUS are shown in Fig. 3. Until present, no LC-MS data and CID mass spectra of both compounds were described in literature, whereas EI-MS spectra from GC-MS analysis were previously published [22, 33]. CUS was available as a reference substance. In the CID fragment spectrum (Fig. 3b), the fragment m/z 84.0808 ($C_5H_{10}N$) dominates besides m/z 42.0340 (C_2H_4N). The molecular ion $[M+H]^+$ 225.1946 has a very low intensity despite optimised collision energy. At higher sensitivity, further fragments appear (insert in Fig. 3b) at 114.0657, 128.1109 ($C_7H_{14}NO$), 142.1204 ($C_8H_{16}NO$), 166.1550 ($C_{10}H_{18}NO$) and 209.1974 ($C_{12}H_{21}N_2O$). A corresponding fragmentation scheme is proposed in Fig. 4. The peak m/z 84.0808 is attributed to the Δ^1 -dihydropyrrolinium cation which causes the base peak and is further fragmented by elimination of propene to $[CH_5-N \equiv CH]^+$ also in agreement with the EI-MS spectrum [22]. A structural explanation for $m/z=114.0657$ was not found.

HYG was identified by LC-QTOF-MS data from the coca leaf extract. Besides the agreement of the accurate MS data with the molecular formula $C_8H_{15}NO$ ($[M+H]^+$, m/z 142.1215), also the fragments m/z 42.0340 and 84.0803 (Δ^1 -dihydropyrrolinium cation) support the structure of HYG in the accurate mass spectrum (Fig. 3b). No further characteristic fragments could be detected also at different collision energy. The fragments 84 and 42 are also the most abundant fragment ions in the EI-MS spectrum of HYG [22, 33].

The hair extracts from all samples were measured in MS- as well as auto-MS/MS mode of LC-QTOF-MS. The chromatograms of the coca chewer CC-19 and of the cocaine user CU-17 are compared as typical examples in Fig. 5. The files from the coca chewers were systematically searched for possible

Fig. 3 Accurate CID mass spectra of HYG as a constituent of the coca leaf extract (a, CID energy 3 eV) and of CUS (b, reference substance, CID energy 3 eV) measured by LC-QTOF-MS

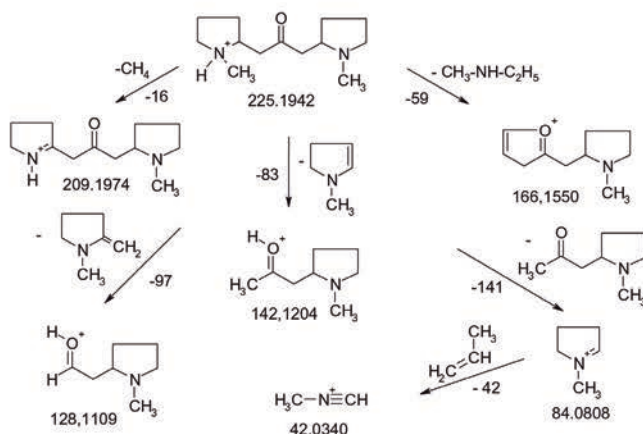


metabolites of HYG and CUS using pre-calculated molecular ions $[M+H]^+$ of products from hydroxylation, demethylation and others. Two metabolites of cuscohygrine were found in almost all cases at 12.4 min (CUS-M1, $m/z=241.1899$, $C_{13}H_{24}N_2O_2$) and 15.2 min (CUS-M2, $m/z=225.1615$,

$C_{12}H_{20}N_2O_2$). Both metabolites were not detected in the extract from coca leaves as well as in any of the hair samples from cocaine users.

Figure 6 shows the CID fragment spectra of both metabolites. CUS-M1 is a hydroxy-cuscohygrine. Besides the main

Fig. 4 Proposed CID fragmentation scheme of CUS derived from the accurate CID mass spectrum in Fig. 3b



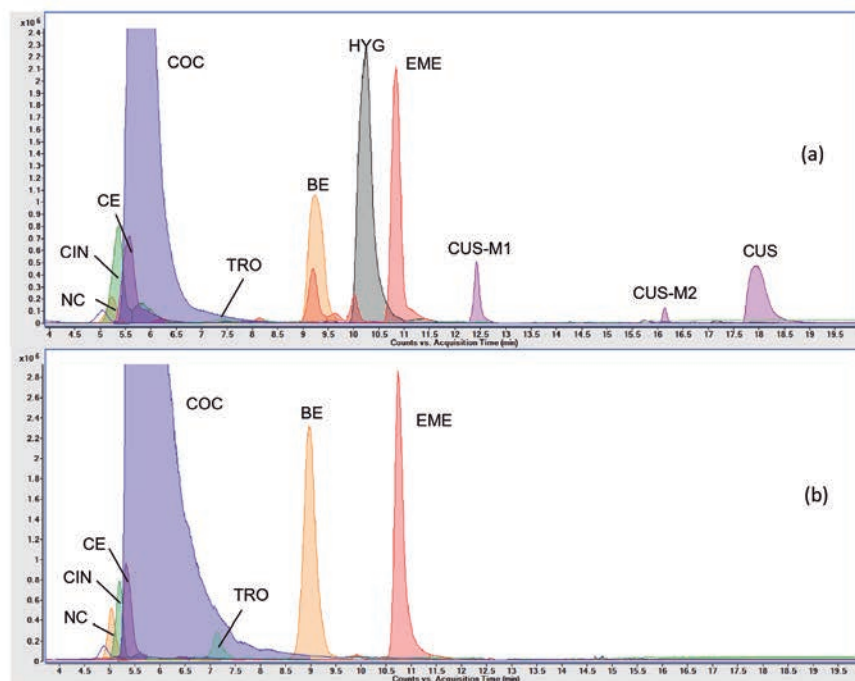


Fig. 5 HILIC-QTOF-MS chromatograms of the hair extracts of **a** coca chewer CC-19 and **b** cocaine user CU-17

fragment 84.0818 (Δ^1 -dihydropyrrolium cation), a fragment with $m/z=158.1167$ is seen which corresponds to the removal of *N*-methylpyrrolidine as the neutral fragment. For lack of further specific fragments, the position of the hydroxyl group could not be located from the spectrum. This metabolite was detected in the LC-QTOF-MS chromatograms of 16 of the 28 samples from coca chewers. It was not included in the more sensitive LC-MS/MS method since this was run before the metabolite search.

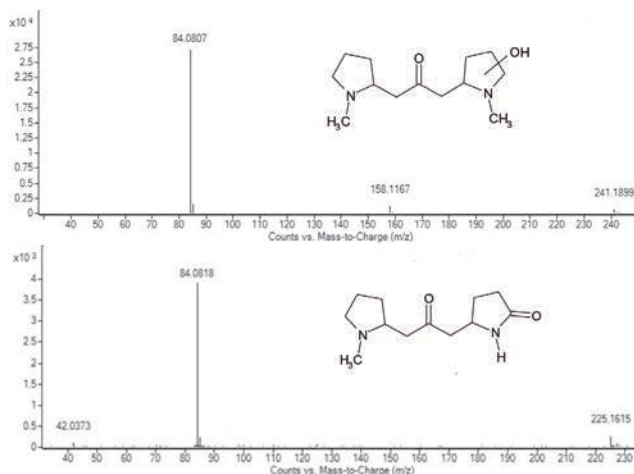
CUS-M2 has the same nominal m/z (225.2) as CUS and provides the same MRM transitions 225.2 \rightarrow 84.1 and 225.2 \rightarrow 42.1 (Table 2). Therefore, it was accidentally included in the LC-MS/MS method already before the search for metabolites and was detected in all coca chewer samples. But, the mass spectrum (Fig. 6b) showed a different accurate mass of $[M+H]^+$ (m/z 225.1615 corresponding to the molecular formula $C_{12}H_{20}N_2O_2$, as compared to m/z 225.1946, $C_{13}H_{24}N_2O$ for CUS). This can be explained by the metabolic

combination of demethylation, hydroxylation and dehydrogenation. The fragments 84.0818 and 42.0373 prove that at least one *N*-methyl-pyrrolidyl ring remained unchanged. Therefore, as a proposed metabolic pathway, the second ring could have been transformed by these three steps into *N*-methylpyrrolidone as shown by the structural formula in Fig. 6b. This would be an analogue to the metabolic formation of norcotinine from nicotine. No further characteristic fragments above the general background could be found also at changed CID energy in order to confirm this proposal. Further studies including urine samples from coca chewers are in progress in order to explore the metabolites of CUS and HYG.

Concentrations in hair of coca chewers and cocaine users

It can be seen from the examples in Fig. 5a and b that cocaine and its four metabolites as well as cinnamoylcocaine and tropacocaine were identified in the chromatograms of both

Fig. 6 Accurate CID mass spectrum of the metabolites CUS-M1 (RT=12.4 min) and CUS-M2 (RT=15.2 min) in hair of coca chewers



coca chewers and cocaine users. The most obvious difference between both chromatograms is the presence of hygrine and cuscohygrine and its metabolites CUS-M1 and CUS-M2, which were not found in the sample from the cocaine user at the lower sensitivity of the LC-QTOF-MS method.

Coca chewers The concentrations determined by LC-MS/MS in hair of all coca chewers are given in Table 3. The cocaine concentrations ranged from 0.085 ng/mg in sample CC-05 to 75.5 ng/mg in the distal segment of sample CC-25. Comparison with the self-reported chewing frequency given in Table 1 showed no clear relationship. Volunteer CC-23 reported one ball of 5 g per month with 12.2 ng/mg cocaine. From the four volunteers reporting one ball of 5 or 10 g per week (CC-02, CC-03, CC-05 and CC-08), three had only low values between 0.085 and 0.31 ng/mg, but one displayed 34.3 ng/mg. For the five volunteers who reported one ball per day, cocaine ranged from 4.5 to 52.4 ng/mg, and for the 16 volunteers with several balls per day, between 1.29 and 75.5 ng/mg was found.

The metabolites NC, BE and EME were present in all samples. CE was detected in hair of 19 volunteers with concentrations between 0.15 and 13.8 ng/mg and in traces in further five cases showing that coca is frequently chewed in combination with alcohol. The drug/metabolite ratios will be discussed below in the section "Differentiation between coca chewers and cocaine users" in comparison with the German cocaine users.

The coca alkaloids CIN, TRO and CUS as well as the metabolite CUS-M2 were also detected in all samples. The concentration of CUS ranged from 0.028 to 24.7 ng/mg. For CUS-M2, which provided the same MRM transitions as CUS, only relative concentrations are given. These were calculated from the measured peak areas using the calibration curve of CUS with EME-d3 as the internal standard. CUS-M1 which was only included in the LC-QTOF-MS measurement was found in 16 samples. This lower detection frequency can probably be explained rather by the lower sensitivity of this method than by its real absence in the remaining samples.

Also, for HYG, only relative concentrations could be obtained since no reference substance was available. The values given in Table 3 were calculated as the measured peak area divided by the EME-d3 peak area and the sample weight. With the exception of CC-03 and CC-05 (COC only 0.26 and 0.085 ng/mg respectively), HYG was detected in samples from all coca chewers.

Cocaine users Table 4 shows the concentrations in hair samples from 22 German individuals who were positive for cocaine in a previous drug test in forensic context. No data about the cocaine consumption habits were available in these cases. The investigated hair length was not uniform. The samples were analysed either in full length or in two to four segments for longer hair samples. The cocaine concentrations in the altogether 34 hair segments ranged from 0.39 to 38.7 ng/mg. With the exception of CU-20, the cocaine metabolites NC, BE and EME were detected in all cases. CE was found in 17

Table 3 Concentrations of coca alkaloids and their metabolites in hair of 26 coca chewers determined by LC-MS/MS

Volunteer	COC (ng/mg)	NC (ng/mg)	BE (ng/mg)	EME (ng/mg)	CE (ng/mg)	CIN (ng/mg)	TRO (ng/mg)	CUS (ng/mg)	CUS-M1 ^a	CUS-M2 relative area ^b	HYG relative area ^c
CC-01	13.0	0.38	3.8	1.37	0.30	0.48	0.018	0.203	n.d.	0.54	0.36
CC-02	0.31	0.011	0.16	0.018	0.000	0.016	0.002	0.074	n.d.	0.075	0.003
CC-03	0.27	0.10	0.15	0.022	0.012	0.020	0.004	0.028	pos.	0.013	n.d.
CC-04	4.3	0.045	1.49	0.31	0.011	0.18	0.005	0.18	pos.	0.21	0.049
CC-05	0.085	0.003	0.046	0.014	0.000	0.005	0.002	0.032	pos.	0.011	n.d.
CC-06	50.0	0.91	19.5	2.49	5.46	4.7	0.12	1.18	pos.	2.2	0.80
CC-07	10.0	0.095	4.6	0.85	0.38	0.17	0.011	0.061	n.d.	0.14	0.11
CC-08	34.2	0.98	10.7	0.87	6.5	0.52	0.015	0.23	pos.	0.89	0.22
CC-09	27.8	0.14	5.3	0.29	8.1	2.7	0.036	0.104	n.d.	0.083	0.023
CC-10	9.2	0.050	2.76	0.44	0.006	0.39	0.010	0.35	pos.	0.47	0.21
CC-11	60.1	1.08	17.8	0.83	0.15	11.4	0.16	1.69	pos.	1.5	0.20
CC-12	18.5	0.36	7.6	0.73	0.38	1.92	0.013	0.27	n.d.	0.36	0.14
CC-13	15.4	0.22	6.4	1.7	1.63	0.12	0.020	0.16	n.d.	0.33	0.320
CC-14	15.5	0.10	5.02	0.34	4.1	0.79	0.010	0.93	pos.	0.35	0.12
CC-15	4.5	0.015	1.25	0.17	0.27	0.47	0.010	0.034	n.d.	0.063	0.014
CC-16	12.3	0.087	5.9	0.74	2.38	1.58	0.050	0.070	n.d.	0.17	0.088
CC-17	43.8	0.31	13.2	0.43	9.6	9.4	0.11	1.85	pos.	0.41	0.050
CC-18	42.9	0.51	32.0	5.6	13.6	5.3	0.032	1.30	n.d.	0.096	0.446
CC-19	19.1	0.15	7.3	0.77	1.18	1.93	0.048	3.2	n.d.	0.21	0.182
CC-20	18.8	0.13	14.2	0.32	2.9	0.26	0.031	0.032	n.d.	0.037	0.041
CC-21	1.39	0.028	2.02	0.034	0.16	0.10	0.002	0.35	pos.	0.008	0.010
CC-22	52.4	1.15	22.0	1.35	13.4	5.0	0.083	1.35	pos.	1.14	0.25
CC-23	12.2	0.078	3.9	0.60	1.13	0.61	0.032	0.77	pos.	0.45	0.11
CC-24	2.7	0.031	1.23	0.36	0.029	0.12	0.004	0.26	n.d.	0.19	0.12
CC-25 0–6 ^d	32.5	0.11	20.0	0.77	0.018	3.5	0.026	4.4	pos.	0.20	0.13
CC-25 6–12 ^d	39.7	0.19	29.9	2.8	0.008	9.6	0.048	24.5	pos.	0.84	0.87
CC-25 12–18 ^d	75.5	0.30	36.5	4.59	0.014	16.7	0.066	24.7	pos.	0.72	0.75
CC-26	19.1	0.077	9.0	0.48	13.8	0.91	0.044	0.44	pos.	0.47	0.077

n.d. not detected, pos. positive

^a Result from LC-QTOF-MS, not included in LC-MS/MS^b Relative concentration of cuscohygrine metabolite CUS-M2, calculated using the calibration curve of CUS with the same MRM transitions^c Relative concentration of hygrine per milligram of hair, calculated by $\text{area(hygrine)/area(EME-d3)/sample weight}$ ^d Hair sample CC-25 was analysed in three segments 0–6, 6–12 and 12–18 cm

segments with concentrations between 0.1 and 2.7 ng/mg and in traces in further 13 segments. CIN was seen in 35 segments (0.004–0.628 ng/mg, mean 0.104 ng/mg and median 0.059 ng/mg) and TRO in 32 segments (0.002–0.73 ng/mg, mean 0.084 ng/mg and median 0.016 ng/mg). Traces of CUS between 0.004 and 0.19 ng/mg (mean 0.023 ng/mg and median 0.013 ng/mg) were detected in 34 segments. Both metabolites CUS-M1 and CUS-M2 were not found in any of the cocaine user samples. Traces of HYG were identified by both MRM transitions and retention time in 11 segments. The detection of low concentrations of CUS and HYG in hair of the German cocaine users can be explained only by their

presence in illicit cocaine preparations although they were not found in 25 Italian and 5 Argentinean seized cocaine samples [22].

Differentiation between coca chewers and cocaine users

There are two main possibilities to distinguish between coca chewers and users of cocaine: (a) detection of coca alkaloids which occur in coca leaves but are partially or totally lost during manufacturing of cocaine and (b) typical changes in metabolite/drug ratios of cocaine caused by the different ways of consumption.

Table 4 Concentrations of coca alkaloids and their metabolites in hair segments of 22 German cocaine users determined by LC-MS/MS

Sample No.	Age, gender	Hair colour	Hair length (cm)	COC (ng/mg)	NC (ng/mg)	BE (ng/mg)	EME (ng/mg)	CE (ng/mg)	CIN (ng/mg)	TRO (ng/mg)	CUS (ng/mg)	HYG relative concentration ^a
CU-01	34, M	Fair	0–3	35.1	1.14	29.6	0.32	2.1	0.069	0.78	0.032	0.005
CU-02	23, F	Brown	0–9	23.9	1.06	11.3	0.26	1.82	0.087	0.15	0.008	0.004
			9–18	30.2	1.13	19.5	0.14	1.18	0.27	0.40	0.007	n.d.
CU-03	26, F	Brown	0–12	10.5	0.20	4.4	0.099	2.12	0.14	0.029	0.016	0.003
			12–24	2.05	0.004	1.49	0.014	0.048	0.013	0.009	0.013	n.d.
			24–36	9.1	0.011	3.8	0.046	0.14	0.045	0.023	0.075	n.d.
CU-04	31, F	Dark brown	0–6	11.9	0.19	4.4	0.089	0.85	0.14	n.d.	0.025	n.d.
			6–12	9.2	0.112	4.3	0.069	0.34	0.14	n.d.	0.025	n.d.
			12–18	3.9	0.090	2.04	0.039	0.14	0.13	n.d.	0.015	n.d.
CU-05	22, F	Brown	0–6	5.6	0.036	1.91	0.043	0.005	0.058	0.008	0.016	n.d.
			6–12	4.6	0.028	1.55	0.031	0.002	0.044	0.014	0.047	n.d.
			12–18	5.3	0.035	1.45	0.034	0.003	0.053	0.010	0.19	n.d.
			18–24	6.6	0.064	1.36	0.040	0.005	0.080	0.007	0.017	n.d.
CU-06	39, M	Brown	0–3	30.3	0.61	6.7	0.17	0.005	0.46	0.12	0.040	0.003
CU-07	39, M	Brown	0–6	28.8	0.53	4.9	0.11	2.03	0.63	0.17	0.015	n.d.
CU-08	23, F	Black	0–10	7.4	0.010	0.54	0.016	0.003	0.066	0.015	0.010	n.d.
CU-09	28, F	Brown	0–10	3.0	0.073	1.87	0.22	0.025	0.005	0.005	0.028	0.003
			10–20	2.0	0.057	0.46	0.037	0.009	0.012	0.006	n.d.	n.d.
			20–30	2.2	0.049	0.34	0.032	0.011	0.009	0.008	n.d.	n.d.
CU-10	37, M	Brown	0–6	4.5	0.006	0.84	0.044	0.29	0.037	0.010	0.007	n.d.
CU-11	34, M	Brown	0–6	1.08	0.054	0.19	0.011	0.003	0.000	0.004	n.d.	n.d.
CU-12	34, F	Fair	0–6	1.8	0.071	0.26	0.018	0.13	0.004	0.004	n.d.	n.d.
			6–12	3.2	0.13	0.33	0.012	0.077	0.009	0.037	0.006	n.d.
CU-13	31, M	Brown	0–6	2.7	0.060	0.44	0.005	0.001	0.003	0.006	0.005	0.004
CU-14	49, M	Brown	0–7	11.5	0.37	1.31	0.043	0.143	0.11	0.018	0.009	0.003
CU-15	No data	No data	No data	13.8	0.47	1.71	0.027	0.014	0.060	0.043	0.032	0.014
CU-16	26, F	Brown	0–12	38.7	0.15	4.6	0.26	0.30	0.20	0.33	0.010	n.d.
CU-17	7	Brown	0–6	21.8	0.16	2.4	0.031	0.17	0.11	0.12	n.d.	n.d.
CU-18	32, F	Fair	0–8	1.5	0.082	0.33	0.019	0.000	0.020	0.006	n.d.	n.d.
CU-19	52, M	Brown	0–4	4.5	0.049	0.52	0.007	0.002	0.031	0.009	0.004	0.006
CU-20	26, M	Brown	0–6	0.38	0.009	0.000	0.002	0.001	0.004	n.d.	0.007	n.d.
			6–12	1.01	0.019	0.000	0.005	0.003	0.012	0.002	0.005	n.d.
CU-21	26, M	Black	0–6.5	6.0	0.24	0.61	0.012	0.003	0.021	0.067	n.d.	n.d.
CU-22	39, M	Brown	0–7	14.6	0.43	1.30	0.057	2.7	0.35	0.037	0.014	n.d.

n.d., not detected

^aRelative concentration of hygrine per mg hair calculated by $\text{area}(\text{HYG})/\text{area}(\text{EME-d3})/\text{sample weight}$

For both possibilities, the concentration ratio to cocaine should be more significant than the absolute concentration. Therefore, in Table 5, the range, mean and median of the concentration ratios of CIN, TRO, CUS, HYG, BE, NC, EME and CE to COC are compared between coca chewers and cocaine users, and the ratios were statistically tested for significant difference between both groups by ANOVA. Furthermore, the box and whisker plots are compared in Fig. 7.

From the coca alkaloids, there is no significant difference only for TRO/COC. The ratios are especially higher in the case of the coca chewers for CIN, CUS and HYG, and there is almost no overlap between the ranges of both consumer groups. Therefore, these substances are suitable markers for coca chewing. This is particularly the case for CUS and HYG where only traces were found in some samples from the cocaine users. But, because of these traces, lower limits for the concentrations in relation to cocaine should be defined as

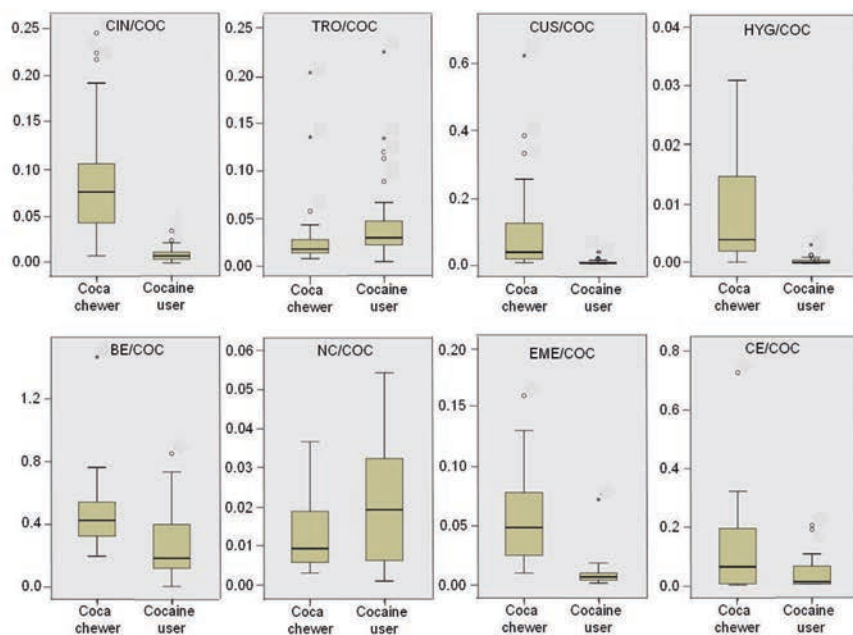
Table 5 Coca alkaloid/cocaine and cocaine metabolite/cocaine concentration ratios in hair of coca chewers and cocaine users and ANOVA test for differences of these ratios between both groups

Coca chewers				Cocaine users			ANOVA			
Concentration ratio	Range	Mean	Median	Range	Mean	Median	α	F	Difference significant	
CIN/COC	0.008–0.243	0.087	0.076	0.000–0.034	0.009	0.008	0.000	53.495	Yes	
TRO/COC	0.0004–0.0201	0.0028	0.0015	0.0001–0.0223	0.0042	0.0027	0.218	1.547	No	
HYG/COC ^a	0.0002–0.031	0.0090	0.0041	0.0000–0.0032	0.0004	0.0002	0.000	26.917	Yes	
CUS/COC	0.002–0.614	0.098	0.034	0.000–0.036	0.004	0.002	0.000	15.394	Yes	
NC/COC	0.003–0.037	0.013	0.095	0.001–0.054	0.021	0.019	0.030	4.968	Yes	
BE/COC	0.19–1.45	0.47	0.56	0.00–0.84	0.18	0.26	0.000	13.504	Yes	
EME/COC	0.0097–0.160	0.057	0.048	0.001–0.072	0.0088	0.0066	0.000	46.017	Yes	
CE/COC	0.000–0.722	0.118	0.061	0.000–0.201	0.034	0.0080	0.004	9.176	Yes	

^aFor hygrine, the relative concentration calculated by area(hygrine)/area(EME-d3)/sample weight was used for this comparison; see text. Three outliers of coca chewers with extremely high hygrine peaks were not included (ratios 3.02, 1.13 and 0.144)

decision criteria rather than the analytical detection alone. The additional detection of the metabolites CUS-M1 and CUS-M2 which were not found in hair of the cocaine users can give

additional evidence. There are only relative values of HYG in Table 5 since it was not available as a pure reference substance but only in coca leaves. Although these results show clearly

**Fig. 7** Box and whisker plots of the concentration ratios of other coca alkaloids and cocaine metabolites to COC in hair compared between coca chewers and cocaine users

the advantage of HYG for this discrimination, further quantitative investigations with the pure reference substance are necessary in order to define the typical HYG/COC range in hair of coca chewers.

Concerning the cocaine metabolites, the ANOVA test showed significant differences of the ratio between both consumer groups for NC, BE, EME and CE. This can be explained by metabolic differences since the drug is at least partly absorbed in the gastrointestinal tract in the case of chewing. The ratios for BE, EME and CE are higher for coca chewers, whereas that for NC is slightly higher for cocaine users. In the case of CE, different use of alcoholic beverages during coca chewing or cocaine consumption should play a role. However, with the exception of EME, the ranges of the ratios overlap strongly, which makes their use for discrimination between both groups questionable. In contrast, the mean ratio EME/COC is about one order of magnitude higher for coca chewers, and there is almost no overlap between the ranges of both groups. This should be caused both by its high content in coca leaves [13–16] and by the enhanced hydrolysis of cocaine to EME in the chewing process.

The higher ratio EME/COC in hair of coca chewers is also obvious from literature data if ester hydrolysis during hair extraction was avoided by neutral pH and non-digestive conditions. From the concentrations described by Möller et al. for 20 coca chewers [25], EME/COC between 0.122 and 0.841 (mean 0.267 and median 0.195) is calculated, and from the concentrations described for five coca chewers by Henderson et al. [24], EME/COC ranges from 0.066 to 0.152 (mean 0.096 and median 0.088). On the other hand, the ratios described for cocaine users are clearly lower [34–36]. For instance, Cordero et al. determined in 360 post-mortem hair segments EME/COC ratios <0.01 to 0.46 (mean 0.04 and median 0.02) [34]. Similar results were found by Bourland et al. (range <0.01–0.05, mean 0.02 and median 0.02) [35] and by Politi et al. (range <0.01–0.45, mean 0.05 and median 0.03) [36]. Because of possible cocaine hydrolysis in hair as well as during sample preparation, the EME/COC ratio must be interpreted with care and should be used only in combination with other criteria.

Despite the relatively low number of 26 coca chewers and 22 cocaine users, a receiver operation characteristic (ROC) analysis was performed for a preliminary estimation of the discrimination performance. With areas under the ROC curves of 0.93 to 0.97, the tests appeared to be highly accurate for CIN/COC, CUS/COC, EME/COC and HYG/COC. According to these ROC data, coca chewing would be detected by the following discrimination criteria CIN/COC >0.02 (sensitivity 0.86 and specificity 0.92), CUS/COC >0.01 (sensitivity 0.86 and specificity 0.83) and EME/COC >0.015 (sensitivity 0.89 and specificity 0.94). No corresponding limit can be given for HYG because of the missing reference substance. However, this is only a preliminary orientation,

and further studies with a larger number of individuals including South American cocaine users are necessary for the determination of sufficiently confirmed cut-off values.

Whereas the concentration ratios of CIN, CUS, HYG and EME to COC in hair can sufficiently prove that the findings originate to a high degree from use of coca leaves, they cannot exclude additional abuse of cocaine. For this purpose, markers of the different kinds of cocaine use are required. The detection of typical cutting agents or adulterants is a strong indication of using manufactured cocaine. Therefore, all hair samples of this study were also screened by LC-QTOF-MS for such substances. The most frequent cutting agent at present levamisole was found in 17 from 22 cocaine users, whereas it was not seen in any of the 26 samples from the coca chewers. Lidocaine and paracetamol were identified 6× and 3× in hair from the cocaine users and 3× and 1× in hair from the coca chewers. However, these drugs can also originate from medical application. Caffeine was detected in both groups (18× and 20×) and is not specific. This applies also to several further medical drugs which were identified in some of the samples from both groups and to other illegal drugs found in some of the samples from the cocaine users.

The presence of cocaine cutting agents such as levamisole is typical for Europe or USA but not necessarily for the South American countries where smoking of coca paste is a preferred kind of abuse. A typical marker of cocaine smoking is anhydroecgonine methyl ester as a pyrolysis product of cocaine [37] which should be included in future studies about this problem.

Conclusions and limits of this study

It follows from the results of this study that hair analysis is a suitable way to discriminate between coca chewers and consumers of manufactured cocaine. Preliminary criteria for coca chewing would be the concentration ratios CIN/COC >0.02, CUS/COC >0.01, EME/COC >0.015 and HYG/COC (typical range still to be determined) as well as the presence of the two cusohygrine metabolites CUS-M1 and CUS-M2. These criteria should be used in combination. An important analytical prerequisite for using such ratios is that hydrolysis of COC by acidic or basic agents during sample preparation is excluded.

However, these criteria cannot exclude use of cocaine in addition to coca chewing. Evidence against coca chewing can be obtained by detection of typical adulterants. Furthermore, anhydroecgonine methyl ester as a marker of cocaine smoking should be included in the analysis in future studies.

Limitations of this study are that no uniform hair lengths could be analysed and that hygrine and the metabolites of cusohygrine were not available as reference substances, and

therefore, only relative concentrations could be given. It is another limitation that only European users instead of South American cocaine users were available for comparison since the quality of the manufactured cocaine (e.g. cocaine hydrochloride vs. coca paste) and of the abuse habits (e.g. snorting vs. smoking) should have an influence on the analytical findings. In general, it will not be possible to detect or to exclude an occasional cocaine use in addition to coca chewing by this method.

Nevertheless, the investigation of hair samples can support legal decisions in cases where differentiation between coca chewing and abuse of manufactured cocaine plays a role such as workplace testing or driving ability examination in South American countries. Further investigations are necessary with more samples from coca chewers and South American cocaine users to overcome the limitations and to determine cut-off values for the abovementioned criteria.

Acknowledgments The authors thank Dr. Silvia Galli (Salta, North Argentina) for support in collecting hair samples and consumption data of the coca chewers.

References

- World Health Organization (1952) Expert committee on drugs liable to produce addiction. Third report. WHO technical report series No. 57. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_57.pdf. Accessed 10 March 2014
- United Nations (1961) Single convention on narcotic drugs. http://www.unodc.org/pdf/convention_1961_en.pdf. Accessed 10 March 2014
- United Nations (1988) Convention against illicit traffic in narcotic drugs and psychotropic substances. https://www.unodc.org/pdf/convention_1988_en.pdf. Accessed 10 March 2014
- United Nations (2008) Declaration on the rights of indigenous peoples, adopted 2007 and published by the United Nations (07-58681). http://www.un.org/esa/socdev/unpfii/documents/DRIPS_en.pdf. Accessed 10 March 2014
- Argentine federal law (26052) Published in the official bulletin: 2005 August, Art. 15
- Casikar V, Mujica E, Mongelli M, Aliaga J, Lopez N, Smith C, Bartholomew F (2010) Does chewing coca leaves influence physiology at high altitude? *Indian J Clin Biochem* 25:311–314
- Spielvogel H, Caceres E, Kouhi H, Sempore B, Sauvain M, Favier R (1996) Effects of coca chewing on metabolic and hormonal changes during graded incremental exercise to maximum. *J Appl Physiol* 80: 643–649
- Spielvogel H, Rodríguez A, Sempore B, Caceres E, Cottet-Emard JM, Guillon L, Favier R (1997) Body fluid homeostasis and cardiovascular adjustments during submaximal exercise: influence of chewing coca leaves. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 75:400–406
- Galarza Guzmán M, Peñaolazmalta R, Echalar Afcha L, Aguilar Valerio M, Spielvogel H, Sauvain M (1997) Effects of coca chewing on the glucose tolerance test. *Med (B Aires)* 57:261–264
- Hurtado-Gumucio J (2000) Coca leaf chewing as therapy for cocaine maintenance. *Ann Med Interne (Paris)* 151(Suppl B):B44–48
- Rivier L (1981) Analysis of alkaloids in leaves of cultivated *Erythroxylum* and characterization of alkaline substances used during coca chewing. *J Ethnopharmacol* 3:313–335
- Novák M, Salemkink CA, Khan I (1984) Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum* coca and *Erythroxylum novogranatense*. *J Ethnopharmacol* 10:261–274
- Moore JM, Casale JF, Klein RF, Cooper DA, Lydon J (1994) Determination and in-depth chromatographic analyses of alkaloids in South American and greenhouse-cultivated coca leaves. *J Chromatogr A* 659:163–175
- Johnson EL, Emche SD (1994) Variation of alkaloid content in *Erythroxylum* coca leaves from leaf bud to leaf drop. *Ann Bot* 73: 645–650
- Johnson EL (1995) Content and distribution of *Erythroxylum* coca leaf alkaloids. *Ann Bot* 76:331–335
- Jenkins AJ, Lloza T, Montoya I, Cone EJ (1996) Identification and quantitation of alkaloids in coca tea. *Forensic Sci Int* 77:179–89
- Glass RL, Johnson MB (1996) Analysis of cuscohygrine in coca leaves by high-performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 19:1777–1784
- Glass RL (1997) Analysis of hygrine and cuscohygrine in coca leaves using gas chromatography and high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 45:3114–3117
- Casale JF, Toske SG, Colley VL (2005) Alkaloid content of the seeds from *Erythroxylum* coca var. coca. *J Forensic Sci* 50:1402–1406
- Casale JF, Klein RFX (1993) Illicit production of cocaine. *Forensic Sci Rev* 5:95–107
- Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syed Q, Bellis M (2011) Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Test Anal* 3:89–96
- Rubio C, Strano-Rossi S, Tabernero MJ, Anzillotti L, Chiarotti M, Bermejo AM (2013) Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Sci Int* 227:60–63
- Pragst F, Balikova MA (2006) State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* 370:17–49
- Henderson GL, Harkey MR, Zhou C, Jones RT (1992) Cocaine and metabolite concentrations in the hair of South American coca chewers. *J Anal Toxicol* 16:199–201
- Möller MR, Fey P, Rimbach S (1992) Identification and quantitation of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, in hair of Bolivian coca chewers by gas chromatography/mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 16:291–296
- Springfield AC, Cartmell LW, Aufderheide AC, Buikstra J, Ho J (1993) Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers. *Forensic Sci Int* 63:269–275
- Cartmell LW, Aufderheide A, Weems C (1991) Cocaine metabolites in pre-Columbian mummy hair. *J Okla State Med Assoc* 84:11–12
- Broecker S, Herre S, Pragst F (2012) General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF–MS). *Forensic Sci Int* 218:68–81
- Broecker S, Herre S, Wüst B, Zweigenbaum J, Pragst F (2011) Development and practical application of a library of CID accurate mass spectra of more than 2,500 toxic compounds for systematic toxicological analysis by LC–QTOF–MS with data-dependent acquisition. *Anal Bioanal Chem* 400:101–117
- Peters FT, Drummer OH, Müsshoff F (2007) Validation of new methods. *Forensic Sci Int* 165:216–224
- Schmitt G, Herbold M, Peters F (2009) Methodenvalidierung im forensisch-toxikologischen Labor. Auswertung von Validierungsdaten nach den Richtlinien der GTFCh mit VALSTAT. Arvecon, Walldorf
- Quintela O, Lendoiro E, Cruz A, de Castro A, Quevedo A, Jurado C, López-Rivadulla M (2010) Hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HILIC–MS/MS) determination of cocaine and its metabolites benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, and cocaethylene in hair samples. *Anal Bioanal Chem* 396:1703–1712

33. Lüning B, Leander K (1965) Studies on Orchidaceae alkaloids. III. The alkaloids in *Dendrobium primulinum* Lindl and *Dendrobium chrysanthum* Wall. *Acta Chem Scand* 19:1607–1611
34. Cordero R, Lee S, Paterson S (2010) Distribution of concentrations of cocaine and its metabolites in hair collected postmortem from cases with diverse causes/circumstances of death. *J Anal Toxicol* 34:543–548
35. Bourland JA, Hayes EF, Kelly RC, Sweeney SA, Hatab MM (2000) Quantitation of cocaine, benzoylecgonine, cocaethylene, methylecgonine, and norcocaine in human hair by positive ion chemical ionization (PCI) gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 24:489–495
36. Politi L, Zucchella A, Morini L, Stramesi C, Poletti A (2007) Markers of chronic alcohol use in hair: comparison of ethyl glucuronide and cocaethylene in cocaine users. *Forensic Sci Int* 172:23–27
37. Kintz P, Cirimele V, Sengler C, Mangin P (1995) Testing human hair and urine for anhydroecgonine methyl ester, a pyrolysis product of cocaine. *J Anal Toxicol* 19:479–482



Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of “paco” (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations

N.C. Rubio^a, F. Krumbiegel^b, F. Pragst^{b,*}, D. Thurmman^b, A. Nagel^b, E. Zytowski^b, M. Aranguren^c, J.C. Gorlelo^c, N. Poliansky^c

^a Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina

^b Institute of Legal Medicine, Charité Berlin, Germany

^c Fundación Convivir, Buenos Aires, Argentina



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 January 2019

Received in revised form 19 January 2019

Accepted 24 January 2019

Available online 5 February 2019

Keywords:

Anhydroecgonine methyl ester

Chewing coca leaves

Cocaine

Hygrine

Cuscohygrine

PACO smoker

ABSTRACT

Background: Hair analysis is a suitable way to discriminate between coca chewers and consumers of manufactured cocaine using the coca alkaloids hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) as markers. In the present preliminary study it was examined whether CUS and HYG can be detected in hair of occasional and moderate coca chewers or coca tea drinkers, whether CUS and HYG appear in hair of PACO consumers (smoking coca paste waste), and whether anhydroecgonine methyl ester (AEME) is a useful cocaine smoking marker in this context.

Method: Three groups were included: 10 volunteers from Buenos Aires with occasional or moderate chewing of coca leaves or drinking coca tea, 20 Argentinean PACO smokers and 8 German cocaine users. The hair samples (1–4 segments) were analyzed by a validated LC–MS/MS method for cocaine (COC), norcocaine (NC), benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME), cocaethylene (CE), cinnamoylcocaine (CIN), tropacocaine (TRO), AEME, CUS and HYG. For comparison, eight samples of coca leaves or coca tea were analyzed.

Results: Only low concentrations of COC were found in hair of seven occasional users of coca leaves or coca tea (0.010–0.051 ng/mg). For three moderate chewers of coca leaves all compounds were detected including AEME but except TRO. The hair samples of PACO smokers contained much higher concentrations of COC (0.027–341 ng/mg, mean 37.4 ng/mg) and its metabolites. CUS was not found in these samples but traces of HYG were seen in 8 of 37 hair segments. AEME as a marker for coca smoking was detected in hair of 15 smokers. In comparison to COC, the concentrations of EME and CIN were higher for PACO smokers than for German cocaine consumers. AEME (56 ± 20 µg/g) was detected in all coca leave and coca tea samples which explains the detection of this substance in hair of coca chewers. Therefore, its use for differentiation between coca chewers and PACO smokers is limited.

Conclusion: CUS remains to be the most suitable marker in hair for chewing coca leaves or drinking coca tea more frequently than two times per month since it does not appear in hair of Argentinean PACO smokers and German cocaine users. Contrary to a previous proposal, the ratios CIN/COC and EME/COC appeared not to be applicable as criteria for this purpose because of the higher concentration of these alkaloids in hair of PACO smokers. More research is needed to assess the value of AEME in hair of South American coca leave or cocaine users.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author at: Institute of Legal Medicine, University Hospital Charité, Turnstraße 21, Building N, 10559, Berlin, Germany.

E-mail addresses: cristinarubio2@gmail.com (N.C. Rubio), franziska.krumbiegel@charite.de (F. Krumbiegel), fritz.pragst@charite.de (F. Pragst),

denise.thurmman@charite.de (D. Thurmman), adamnagel@hotmail.de (A. Nagel), lehmanneric@gmx.de (E. Zytowski), mmaranguren@yahoo.com (M. Aranguren),

jgorlelo@gmail.com (J.C. Gorlelo), nicopoliansky@gmail.com (N. Poliansky).

<https://doi.org/10.1016/j.forensi.2019.01.040>

0379-0738/© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chewing of coca leaves and preparing and drinking of coca tea from coca leaves are legal practices and socially integrated in countries like Argentina, Perú, Bolivia or Chile. There is a Federal Law in Argentina that allow this practice [1]. Contrary to coca leaves, all different kinds of cocaine preparations (cocaine hydrochloride, crack or coca paste) are illegal and banned by national laws in all South American countries. Therefore, it is imperative to find an analytical solution in those cases where cocaine was detected in traffic control or in workplace drugs testing, and the accused claims to consume only coca leaves (chewing or drinking coca tea) but not any kind of processed cocaine.

The hair analysis for drugs of abuse proved to be an essential and very helpful tool to obtain evidence about the exposure of drugs in cases of driving ability examination, workplace testing, drug trafficking, criminal liability, child custody [2,3]. The advantage of hair in comparison to blood, urine or oral fluid is the extended time window, allowing to detect chronic consumption up to years. It was shown in previous papers that the coca alkaloids hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) are suitable markers of coca leaf chewing in urine [4], oral fluid [5] and hair [6]. Because of the hydrophilic behavior, these two alkaloids are lost in the illicit cocaine production and are not only to a minor extent present in manufactured cocaine hydrochloride [7].

In the first study about the discrimination between Argentinean coca chewers and German consumers of manufactured cocaine by hair analysis, some preliminary criteria for coca chewing were proposed based on the detection and concentrations in hair of cocaine (COC), cinnamoylcocaine (CIN), ecgonine methyl ester (EME), HYG and CUS: Concentration ratios CIN/COC > 0.02, CUS/COC > 0.01, EME/COC > 0.015, and HYG (detected, typical range still to be determined) as well as the presence of two cuscohygrine metabolites [6]. These criteria should be used in combination.

An important analytical prerequisite for using such ratios is that the hydrolysis of COC by acidic or basic agents during sample preparation is excluded. However, these criteria cannot exclude the use of cocaine in addition to coca chewing. Evidence against coca chewing can be obtained by detection of typical adulterants such as levamisole or lidocaine. These are a strong indication of using manufactured cocaine in Europe but are not typical for South American countries where smoking of coca paste is a preferred kind of abuse.

Argentina is geographically near to Bolivia and Peru, two main producers of coca leaves. The coca paste is produced in the countries of origin and, in part, is sent to Argentina for finishing the production of cocaine hydrochloride. Paste base is one of the products obtained in the first steps of the extraction of coca leaves. The residue of coca paste is called PACO and is smoked, e.g. in combination with tobacco or cannabis, mainly by the lower social

classes. This way to consume illegal cocaine is increasing in Argentina.

Heating cocaine base leads to the pyrolysis product methyl-ecgonidine (anhydroecgonine methyl ester, AEME) [8,9]. Therefore, it was proposed as a marker in hair to differentiate between smoking and cocaine use via other routes of consumption [10–12]. However, this application of AEME seems to be limited since it was detected as an artifact in GC-MS analysis of cocaine [13] and was repeatedly described as a constituent of some varieties of coca leaf [14–17].

The participants of the previous study [6] were residents from the northwest of Argentina with high tradition of almost daily consuming coca leaves. However, the pattern of consuming of coca leaves is variable in the different regions of Argentina. For instance, few people from Buenos Aires consume coca leaves or drink coca tea only occasionally. Furthermore, there were no studies about cocaine in PACO smokers in Argentina found in literature. In order to assess the efficiency of hair analysis for the discrimination between occasional coca chewers or coca tea drinkers and users of manufactured cocaine, it was investigated in the present study (1) whether CUS and HYG are detectable in hair of occasional chewers of coca leaves or drinkers of coca tea, (2) whether CUS and HYG appear in hair of PACO consumers from Argentina, and (3) whether AEME is useful as a cocaine smoking marker in this context.

2. Materials and methods

2.1. Participants of the study

The project was conducted according to the Helsinki ethical principles for medical research involving human subjects of the World Medical Association. A written informed consent was obtained from each individual and personal data as well as test results were anonymized in a way the identification of the person was impossible.

Three groups of volunteers were included in this study. The first group consisted of 10 adults (CC01–CC10) who live in Buenos Aires city and were moderate or occasional coca chewers or coca tea drinkers, with the self-reported frequency of daily, 1–3 times per week, 2 times per month or even less. Personal data as well as self-reported data about the coca-leaf consumption habits were recorded during sampling and are given in Table 1.

The second group consisted of 20 smokers of paste base (PS01–PS20), in Argentina popularly known as PACO. The volunteers were 9 women and 11 men, aged between 18 to 48 years, with problematic use of psychoactive substances who voluntarily attended outpatient withdrawal treatment. Most of the PACO consumers were polydrug-users and had received treatment previously.

Finally, the third group were 8 German cocaine users (GC1–GC8) with positive results for cocaine in a previous test with

Table 1
Personal data, self-reported consumption habits and hair samples of the coca chewers or drinkers of coca tea.

Volunteer	Age, gender	Occupation	Duration of use, years	Frequency	Amount per use, g	Alkaline additive	Hair color	Hair length [cm]
CC01	28f	Attorney	13 (chewing)	4/year	–	No	Brown	16
CC02	28m	Interior designer	1 (tea)	Occasionally	–	–	Brown	39
CC03	36m	Biochemist	15 (chewing)	2/month	5–10	Yes	Brown	6.5
CC04	28m	Attorney	10 (chewing)	1–2/week	5–10	No	Brown	4
CC05	27m	University student	10 (chewing)	Daily	5	No	Brown	4
CC06	36m	Tourism manager	15 (chewing)	3/week	5–10	Occas.	Black	9.5
CC07	28f	Biologist	14 (chewing)	2/month	5	Yes	Brown	53
CC08	36m	Physician	22 (chewing)	2/month	5	No	Black	4.5
CC09	29m	Public servant	15 (chewing)	6/year	5	No	Brown	2.5
CC10	28m	University student	16 (chewing)	15/year	5–10	Yes	Black	6

forensic background. The hair samples were reanalyzed for comparison in these investigations.

2.2. Preparation of hair samples

Scalp hair samples were collected at the vertex posterior region as close as possible to the skin. The samples with a length below 6 cm were investigated in full length. Longer hair samples were analyzed in 1–4 segments of 6 cm depending on the total length.

The sample preparation was performed according to the method optimized and described in detail in previous papers [6,18]. Briefly, the hair samples were washed with water and acetone, dried and cut to pieces of 1–2 mm length. Between 10–50 mg (depending on available sample amount) were exactly weighed in a 1.5 ml Eppendorf vial. After addition of the deuterated standards, the hair were 2-times extracted for 18 h with 0.5 ml of a mixture of methanol/acetonitrile/2 mM ammonium formate (25:25:50, v/v/v) with gentle shaking at 37 °C. The liquid phase was separated from both extractions, united and evaporated in a nitrogen stream to a residue of 0.5 ml in order to remove most of the organic solvents. Five microlitres of the residue were injected for LC–MS/MS.

2.3. Preparation of coca leaves and coca tea samples

Each four different samples of coca leaves from Argentina and of coca tea bags from Argentina, Bolivia and Columbia were analyzed for comparison with the hair results and particularly in order to confirm the presence of AEME. 50 mg coca leaves were cut to small pieces and extracted with 1 ml methanol by shaking for 24 h at 40 °C. The solutions were stored at –18 °C. For the measurement, a 1:100 dilution was prepared by mixing 10 µl of the extract with 10 µl of internal standards solution and 980 µl acetonitrile.

For the preparation of coca tea, one bag (about 1 g coca leaves) was steeped for 5 min with 200 ml 95 °C hot water. 50 µl of the tea were diluted with 45 µl 10 mM ammonium formate, 400 µl acetonitrile and 5 µl of internal standard solution (1 µg/ml) and stored at –18 °C till measurement.

2.4. Analytical methods

The solvents, reagents, reference substances, internal standards, analytical instrumentation and LC–MS/MS method on a HILIC

column used in this study as well as the optimization and validation of the methods were described in detail in a previous paper [6]. The basic validation was based on international guidelines and included calibration, determination of linear range and linearity (R^2) and determination of the limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ) as well as of the matrix effects [19,20]. All samples were analyzed for cocaine (COC), norcocaine (NC), benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME), cocaethylene (CE), cinnamoylcocaine (CIN), anhydroecgonine methyl ester (AEME), hygrine (HYG), cuscohygrine (CUS) and tropacocaine (TRO). HYG was unambiguously identified by the MS spectrum but could not be quantified in lack of a reference substance and only the peak area ratio HYG/COC was used as a relative measure of the concentration. The calibration of CIN was performed with a reference substance of trans-CIN and was used for quantification of the sum of *cis*- and *trans*-CIN as described previously [6]. AEME was not included in the original method and was added in a re-evaluation for the present study. The limits of quantification LOQ of all analytes in hair were in the range of 10–30 pg/mg.

3. Results and discussion

3.1. Consumers of coca leaves and coca tea

The concentrations of cocaine, its metabolites and other coca alkaloids in the hair segments of the 10 occasional or moderate users of coca leaves or coca tea are shown in Table 2. COC was detected in all samples with a vague relationship to the self-reported consumption frequency. For CC01, CC02, CC09 and CC10 with the lowest frequency COC was below 0.06 ng/mg whereas for CC05 and CC06 with the highest consumption rate 2.02 and 1.83 ng/mg were measured. The metabolites and the other coca alkaloids were found for CC05, CC06 and CC08 with COC concentrations of 0.61–2.02 ng/mg and only partly for CC04 and CC07. TRO was generally not detected in these samples. The preliminary criteria for coca chewing concerning the concentration ratios in hair $EME/COC > 0.015$, $CIN/COC > 0.02$, $CUS/COC > 0.01$, detection of HYG, which were proposed in [6] are fulfilled as far as the substances were quantified but the two metabolites of CUS were not identified.

CE as a marker of combined cocaine and alcohol consumption was detected in hair from eight volunteers with CE/COC ratios between 0.039 and 0.62 (mean 0.29, median 0.30). This high

Table 2
Concentrations of cocaine, cocaine metabolites and other coca alkaloids in hair of moderate users of coca leaves.

Volunteer	Consumption frequency	Segment length, cm	COC [ng/mg]	NC [ng/mg]	BE [ng/mg]	EME [ng/mg]	AEME [ng/mg]	CE [ng/mg]	CIN [ng/mg]	CUS [ng/mg]	HYG/COC peak area ratio ^a	TRO [ng/mg]
CC01	4/year	0–6	0.022	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		6–12	0.015	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		12–16	0.021	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CC02	Occasionally	0–6	0.0078	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		6–12	0.0099	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		12–18	0.025	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CC03	2/month	0–6.5	0.0097	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CC04	1–2/week	0–4	0.10	n.d.	0.27	0.019	n.d.	0.026	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CC05	Daily	0–6	2.02	0.11	0.64	0.22	0.092	0.10	0.15	n.d.	0.031	n.d.
CC06	3/week	0–6	1.83	0.061	0.37	0.17	pos.	0.71	0.18	pos.	0.023	n.d.
		6–9.5	1.36	0.027	0.30	0.026	pos.	0.44	0.15	0.097	0.0062	n.d.
CC07	2/month	0–6	0.069	n.d.	0.018	0.084	n.d.	0.020	pos.	pos.	0.038	n.d.
		6–12	0.025	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0089	pos.	n.d.	n.d.	n.d.
		12–18	0.011	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		18–24	0.0084	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CC08	2/month	0–4.5	0.61	0.012	0.085	0.039	pos.	0.024	0.029	0.13	0.0098	n.d.
CC09	6/year	0–2.5	0.039	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CC10	15/year	0–6	0.051	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.032	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. = not detected, pos. = detected, <LOQ.

^a Identified by mass spectrum in comparison to coca leaves, no reference substance available.

occurrence of CE in hair of coca chewers was also found in the previous study [6] and can be explained by the fact that the habit to chew coca leaves, in general, is after lunch or dinner when it is common to drink alcoholic beverages, most frequently wine.

Surprisingly, 0.092 ng/mg AEME was detected in hair of CC05 with daily coca chewing, and traces of AEME were also identified in the samples from CC06 and CC08. Since the volunteers of this group denied smoking of any coca products, this result can only be explained by the presence of AEME in coca leaves or by its formation during storage or chewing. The formation of AEME as an artifact in the LC–MS/MS analysis after injection of cocaine or ecgonine methyl ester was excluded in this LC–MS/MS study. AEME as a constituent of coca leaves or coca tea was described previously by Novak et al. [14], Jenkins et al. [15], Zuanazzi et al. [16] and Casale et al. [17]. The latter authors determined AEME to be a primary constituent and not an analytical artifact. Furthermore, Reichardt detected AEME in coca tea as well as in oral fluid immediately after drinking of coca tea in her thesis [21]. The presence of AEME in samples of coca leaves and coca tea was also confirmed in the present study (section 3.4).

Altogether, it follows from the results in Table 2 and the literature that the discrimination between coca chewers and consumers of manufactured cocaine is not possible for occasional and low consumption frequency and that the detection of AEME in hair of coca chewers does not unambiguously prove smoking of cocaine products but can be explained by its presence in coca leaves or its formation during storage of the leaves or during tea preparation.

3.2. PACO smokers

Hair testing results of paste base smokers were not reported previously. The results of the group of 20 smokers of PACO (paste base) in withdrawal treatment are shown in Table 3. The concentration of COC varies in a wide range from 0.027 ng/mg for PS05 to 341 ng/mg for PS19. The metabolites NC, BE and EME were detected and could be quantified in almost all hair samples. With the exception of PS08 and two segments of PS05 with the lowest COC concentrations, CE was also found in all samples too, showing that combined alcohol consumption played a role also for PACO smokers.

AEME was detectable in hair of 15 volunteers of this group with 0.07–9.4 ng/mg (mean 1.14 ng/mg, median 0.53 ng/mg, 0.7–10.8% of the COC concentration). Besides the samples with lowest COC concentrations from PS05 and PS08, AEME was also not found in hair of PS12, PS14 and PS17 with 1.72–4.28 ng/mg COC. These concentrations are in the same range or slightly lower than the data about AEME in hair of cocaine consumers in Europe and America reported by Kintz et al. (7 positive out of 65, 0.2–2.4 ng/mg [10]), Tsanaclis and Wicks (635 positive out of 7146, 0.1–80.9 ng/mg, median 0.8 ng/mg [22]), Cognard et al. (0–45 ng/mg, mean 7.3 ng/mg, median 2.5 ng/mg [23]) and Pego et al. (5 positive out of 7, 0.2–4.9 ng/mg [24]). However, the analysis in these previous investigations was performed by GC/MS and increased results by formation of AEME as an artifact at high GC temperatures cannot be excluded [13]. Nevertheless, the relative high abundance of 75% positive AEME results in hair of the PACO smokers in

Table 3
Concentrations of cocaine, cocaine metabolites and other coca alkaloids in hair of PACO smokers in withdrawal treatment.

Volunteer	Age, gender	Segment, cm	COC [ng/mg]	NC [ng/mg]	BE [ng/mg]	EME [ng/mg]	AEME [ng/mg]	CE [ng/mg]	CIN [ng/mg]	CUS [ng/mg]	Area ratio ^a HYG/COC	TRO [ng/mg]
PS01	18f	0–6	2.27	0.088	0.9785	0.047	0.099	0.030	0.22	n.d.	n.d.	n.d.
		6–12	4.50	0.040	2.08	0.031	0.18	0.017	0.24	n.d.	n.d.	n.d.
		12–18	5.62	0.026	2.25	0.033	0.21	0.012	0.25	n.d.	n.d.	n.d.
		18–24	5.78	n.d.	2.24	0.043	0.18	0.011	0.30	n.d.	n.d.	n.d.
PS02	29f	0–6	92.0	1.12	14.1	1.07	0.89	6.1	3.97	n.d.	n.d.	n.d.
		6–12	96.3	0.55	15.8	0.70	1.04	2.46	4.95	n.d.	n.d.	n.d.
PS03	29f	0–6	66.6	2.97	19.4	4.33	1.81	2.05	10.6	n.d.	n.d.	n.d.
		6–12	71.9	1.07	34.7	3.98	1.59	0.74	7.8	n.d.	n.d.	n.d.
		12–18	59.2	0.41	34.5	3.65	1.17	0.24	5.4	n.d.	n.d.	n.d.
		18–24	57.5	0.36	32.3	2.91	1.20	0.17	6.3	n.d.	n.d.	n.d.
PS04	30f	0–9	7.80	0.67	4.46	0.14	0.41	0.089	0.93	n.d.	n.d.	n.d.
		9–18	9.47	0.14	8.47	0.20	0.40	0.032	0.62	n.d.	n.d.	n.d.
PS05	35f	0–6	0.083	0.0073	0.080	pos.	n.d.	0.0074	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		6–12	0.12	0.0052	0.12	0.0054	n.d.	pos.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		12–18	0.035	pos.	0.046	pos.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		18–24	0.027	pos.	0.016	pos.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PS06	36f	0–9	3.73	0.084	1.14	0.073	0.073	0.45	0.47	n.d.	n.d.	n.d.
		9–18	7.97	0.044	2.08	0.32	0.13	0.098	0.559	n.d.	n.d.	n.d.
PS07	37f	0–8	43.8	3.16	10.4	3.21	2.05	0.38	3.2	n.d.	n.d.	n.d.
		8–16	65.8	3.58	23.6	2.38	3.44	0.35	5.0	n.d.	n.d.	n.d.
PS08	38f	0–6	0.080	pos.	0.021	0.005	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
		6–12	0.42	0.014	0.078	0.0089	n.d.	n.d.	0.046	n.d.	n.d.	n.d.
		12–30	0.079	pos.	0.019	0.0048	n.d.	n.d.	0.012	n.d.	0.00025	n.d.
PS09	44f	0–6	52.1	0.56	8.8	0.43	0.53	0.72	2.61	n.d.	n.d.	n.d.
		6–12	32.6	0.28	9.96	0.35	0.38	0.42	2.12	n.d.	n.d.	n.d.
		12–18	18.7	0.065	2.89	0.226	0.14	0.067	1.22	n.d.	n.d.	n.d.
PS10	21m	0–3	14.6	0.82	2.27	1.26	1.57	0.18	2.76	n.d.	0.0017	n.d.
PS11	28m	0–2.5	51.3	0.70	5.86	1.92	0.36	0.90	1.68	n.d.	0.0012	n.d.
PS12	29m	0–2.5	1.72	0.039	0.36	1.48	n.d.	0.065	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PS13	30m	0–7	169	4.56	39.3	12.7	2.0	4.7	6.17	n.d.	0.00020	n.d.
PS14	30m	0–3.5	4.28	0.067	0.53	0.176	n.d.	0.10	0.17	n.d.	0.0049	n.d.
PS15	30m	0–4.5	23.7	0.76	5.19	0.67	0.57	0.47	0.86	n.d.	n.d.	n.d.
PS16	31m	0–5	30.6	1.24	3.68	1.99	0.39	1.98	1.16	n.d.	0.00039	n.d.
PS17	35m	0–5.5	2.67	0.020	0.23	0.021	n.d.	1.11	0.099	n.d.	0.0033	n.d.
PS18	36m	0–2	4.60	0.021	0.32	0.076	0.093	0.072	0.16	n.d.	n.d.	n.d.
PS19	37m	0–3	341	5.74	6.92	6.75	9.4	1.69	45.1	n.d.	n.d.	n.d.
PS20	48m	0–8	19.5	0.73	8.30	0.38	0.61	0.010	0.96	n.d.	0.00035	n.d.

n.d. = not detected, pos. = detected, <LOQ.

^a Identified by mass spectrum in comparison to coca leaves, no reference substance available.

comparison to the literature data supports its origin from pyrolysis of paste base.

Application of the preliminary criteria for coca chewing described in Ref. [6] to these samples led to the following results: Only the criterion CUS/COC > 0.01 is not fulfilled and excludes coca chewing since CUS was not detected in all samples. However, the ratio CIN/COC of 0.033–0.189 (mean 0.077, median 0.065) exceeds the proposed lower limit for chewing of 0.02 for all samples. The ratio EME/COC is 0.006–0.087 (mean 0.033, median 0.021) and exceeds the proposed lower limit of 0.015 in 23 of the analyzed 39 hair segments, and traces of HYG were detected in 8 hair segments. That means that from these criteria only the absence of CUS excludes coca chewing as the reason of the positive cocaine results for all participants in this group.

3.3. German cocaine consumers

For comparison, hair samples of 8 German cocaine consumers (GC1–GC8), who were tested positive previously in different context, were included in the study. The results are shown in Table 4. The COC concentration ranged from 0.89 to 89.5 ng/mg, and NC, BE and EME were quantifiable in all samples. CE was detected in five samples. Three samples were positive for AEME (0.17–2.85 ng/mg), indicating consumption by smoking. CUS was negative in all samples but traces of HYG were detected in two samples in a similar range as for the PACO smokers (Table 3). CIN was found in two samples but the ratio CIN/COC (0.0007–0.010) was below the typical range for coca chewers (>0.02). However, the ratio EME/COC (0.007–0.21) exceeds the proposed lower limit for chewing of 0.015 in five of the eight samples. Since EME is a hydrolytic metabolite of cocaine it can be formed from COC in the same way as BE by reaction with water within the hair matrix and outside the hair root. Because of this possible hydrolytic formation of EME, the ratio EME/COC appears not to be a specific criterion for coca chewing.

3.4. Anhydroecgonine methyl ester (AEME) in coca leaves and coca tea

In order to explain the detection of AEME in hair of three coca chewers in Table 2 and to confirm previous reports of its presence as a constituent in coca leaves [14–17,21], each four different samples of coca leaves and of coca tea were analyzed as described in section 2.3. The percentage of the alkaloids in the dry plant material is given in Table 5. The results of all 8 samples are in a similar range with COC, CIN, EME and CUS as the main components. HYG was only qualitatively detected. There is no essential difference between the methanolic extraction of the coca leaves and the aqueous extraction with hot water of the tea bags.

The mean content of AEME is $0.0056 \pm 0.0020\%$ ($56 \pm 20 \mu\text{g/g}$). In previous papers, AEME in coca leaves was only qualitatively identified [14–17]. A quantitative determination was only performed in the PhD thesis of Reichardt who found 51–66 ng/ml in 5 samples of tea brewed from 1 g of *Erythroxylum coca* in 250 ml water [21]. Recalculation to the amount of coca leaves leads to 0.0014% AEME at about the same COC content of 0.42% (data given for comparison in Table 5), that is about four times lower than in the present study.

It follows from these results that AEME in hair of coca chewers can originate from its content in coca leaves. Therefore, a positive hair test of AEME in such cases cannot be used as an unambiguous prove of cocaine smoking. It is conceivable that a cut-off of AEME or of its ratio to COC or to EME might be helpful to exclude coca chewing as a reason of a positive AEME result. However, further investigations with a larger number of regular and heavy coca chewers are necessary to verify this possibility. In the present study, the ratio AEME/COC varies too much and is not sufficiently different between the positive samples from 15 PACO smokers (0.007–0.052), four German cocaine consumers (0.022–0.16) and three coca chewers (0.045 or smaller) and is in a similar range as in coca leaves or coca tea 0.0033–0.016.

Table 4
Concentrations of cocaine, cocaine metabolites and other coca alkaloids in hair of German cocaine users.

Volunteer	Age, gender	Segment, cm	COC [ng/mg]	NC [ng/mg]	BE [ng/mg]	EME [ng/mg]	AEME [ng/mg]	CE [ng/mg]	CIN [ng/mg]	CUS [ng/mg]	Area ratio ^a HYG/COC	TRO [ng/mg]
GC1	39m	0–5	2.20	0.0068	0.61	0.019	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.0079	n.d.
GC2	29f	0–6	0.89	0.035	0.42	0.041	n.d.	0.62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GC3	30m	0–1	89.5	2.01	16.6	0.72	2.85	1.42	0.060	n.d.	n.d.	pos.
GC4	29m	0–6	7.9	0.16	1.08	0.054	0.17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GC5	28f	0–6	5.12	0.082	2.54	0.26	n.d.	0.44	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GC6	22m	0–5	3.89	0.025	0.80	0.061	n.d.	0.19	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
GC7	32m	0–6	1.53	0.0096	0.18	0.033	0.25	pos.	n.d.	n.d.	0.0011	n.d.
GC8	25f	0–6	1.94	0.047	0.68	0.052	n.d.	n.d.	0.019	n.d.	n.d.	n.d.

n.d., = not detected, pos. = detected, <LOQ.

^a Identified by mass spectrum in comparison to coca leaves, no reference substance available.

Table 5
Alkaloid content in dry coca leaves and coca tea bags.

Sample ^a	COC, %	CIN, %	EME, %	AEME, %	CUS, %	BE, %
Coca tea 1	0.31	0.21	0.067	– ^b	0.038	0.012
Coca tea 2	0.38	0.048	0.15	0.0029	0.14	0.0051
Coca tea 3	0.41	0.089	0.061	0.0059	0.14	0.024
Coca tea 4	0.36	0.091	0.18	0.0088	0.24	0.027
Coca leaves 1	0.30	0.104	0.11	0.0067	0.11	0.016
Coca leaves 2	0.38	0.067	0.10	0.0041	0.16	0.035
Coca leaves 3	0.25	0.023	0.038	0.0037	0.088	0.012
Coca leaves 4	0.40	0.051	0.093	0.0072	0.16	0.031
Mean	0.35 ± 0.05	0.085 ± 0.05	0.10 ± 0.04	0.0056 ± 0.002	0.13 ± 0.06	0.020 ± 0.01
Coca tea [13]	0.42	–	0.15	0.0014	–	0.15

^a Tea 1: Coca Nasa-Nasa Esh's, Industria Indígena, Colombia, 1.02 g per bag; tea 2: unlabeled, 1.23 g per bag; tea 3: trimate mate, Windsor "es compatir", 1.34 g per bag. Bolivia; tea 4: coca mate, Windsor, "es compatir", 0.77 g per bag, Bolivia. Coca leaves from different sources in North Argentina.

^b Analytical error, value excluded.

4. Conclusions and limitations of the study

Concerning the main reason of this study, the discrimination between coca chewers and users of manufactured cocaine in South America by hair analysis, and in completion of the previous report [6], the following conclusions can be drawn from the results: Caused by the sensitivity of the present routine LC–MS/MS methods in hair analysis with a lower limit of quantification of about 0.01 ng/mg for most drugs and metabolites, the analytical proof of coca chewing is limited to samples with a COC concentration above 0.5 ng/mg and cannot be applied to rare or occasional consumption.

The main marker for coca chewing remains CUS which was not found in hair of the Argentinean PACO smokers and of the German cocaine consumers. The second marker HYG can be used for confirmation, but traces of this marker were also detected in hair of some of the PACO smokers as well as some German cocaine users, showing that it is not completely removed during the illegal cocaine production [7].

Until now, hair results of South American PACO smokers were not described in literature. In comparison to the German cocaine consumers of this and the previous study [6], they provide higher concentrations of EME and CIN in comparison to COC. Obviously, these two coca alkaloids are still contained to a higher degree in PACO, or EME is formed to a higher extent from cocaine as a metabolite or by hydrolysis in hair. Therefore, the preliminary criteria of CIN and EME for coca chewing (CIN/COC > 0.02 and EME/COC > 0.015) proposed in Ref. [6] are not applicable to hair samples from Argentinean PACO smokers.

AEME appears not to be a specific marker for smoking of cocaine base in South America since it is a minor constituent of coca leaves and can occur in hair of coca chewers without smoking. However, this does not concern its use as a crack marker in Europe or North America. In summary, the discrimination between using of coca leaves and manufactured cocaine in forensic cases by hair analysis is only to some extent possible and must be supported by other evidence.

It is a limitation of this preliminary study that, due to the lack of a reference substance, only qualitative results for HYG could be given. Furthermore, no heavy coca chewers were included, particularly for determination of AEME, which was not measured in the first report [6]. Generally, the results must be corroborated by further investigations with more participants and with reliable data about frequency and special manners of coca chewing or PACO smoking in order to elucidate additional factors such as use of basic additives or color and cosmetic treatment of hair.

References

- [1] Argentine Federal Law 23737, art. 15. O.B. October 10, 1989. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/0-4999/138/texact.htm>. (Accessed 15 January 2018).
- [2] F. Pragst, M.A. Balikova, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clin. Chim. Acta* 370 (2006) 17–49.
- [3] F. Pragst, H. Sachs, P. Kintz, Hair analysis for cocaine continues to be a valuable tool in forensic and clinical toxicology, *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 354–355.
- [4] N.C. Rubio, S. Strano-Rossi, M.J. Taberner, J.L. Gonzalez, L. Anzillotti, M. Chiarotti, A.M. Bermejo, Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases, *Forensic Sci. Int.* 243 (2014) 30–34.
- [5] N.C. Rubio, P. Bermejo-Barrera, A.M. Bermejo, A. Moreda-Piñeiro, Development of a reliable method for assessing coca alkaloids in oral fluid by HPLC–MS–MS, *J. Anal. Toxicol.* (November) (2018), doi:<http://dx.doi.org/10.1093/jat/bly076> [Epub ahead of print].
- [6] N.C. Rubio, M. Hastedt, J. Gonzalez, F. Pragst, Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios, *Int. J. Legal Med.* 129 (2014) 69–84.
- [7] N.C. Rubio, D. Thurnmann, F. Krumhölzl, F. Pragst, Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse, *Drug Test. Anal.* 9 (2017) 323–326.
- [8] R.W. Wood, J. Shojale, C.F. Fang, J.F. Graef, Methylcognidine coats the crack particle, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53 (1996) 57–66.
- [9] T. Gostic, S. Klemenc, B. Stefane, A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions, *Forensic Sci. Int.* 187 (2009) 19–28.
- [10] P. Kintz, V. Crimelle, C. Sengler, P. Mangin, Testing human hair and urine for anhydroecgonine methyl ester, a pyrolysis product of cocaine, *J. Anal. Toxicol.* 19 (1995) 479–482.
- [11] P. Kintz, C. Sengler, V. Crimelle, P. Mangin, Evidence of crack use by anhydroecgonine methyl ester identification, *Hum. Exp. Toxicol.* 16 (1997) 123–127.
- [12] K.A. Scheidweiler, M.A. Plessinger, L. Shojale, R.W. Wood, T.C. Kwong, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylcognidine, a crack cocaine pyrolyzate, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 307 (2003) 1179–1187.
- [13] S.W. Toennes, A.S. Fandiño, F.J. Hesse, G.F. Kauert, Artifact production in the assay of anhydroecgonine methyl ester in serum using gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 792 (2003) 345–351.
- [14] M. Novak, C.A. Saleminik, I. Khan, Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense*, *J. Ethnopharmacol.* 10 (1984) 271–274.
- [15] A.J. Jenkins, T. Lloa, I. Montoya, E.J. Cone, Identification and quantitation of alkaloids in coca tea, *Forensic Sci. Int.* 77 (1996) 179–189.
- [16] J.A. Zuanazzi, V. Tremea, R.P. Limberger, M. Sobral, A.T. Henriques, Alkaloids of *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil, *Biochem. Syst. Ecol.* 29 (2001) 819–825.
- [17] J.F. Casale, S.C. Toke, V.L. Colley, Alkaloid content of the seeds from *Erythroxylum coca* var. *coca*, *J. Forensic Sci.* 50 (2005) 1402–1406.
- [18] S. Broecker, S. Herre, F. Pragst, General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF–MS), *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 68–81.
- [19] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Müsshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216–224.
- [20] G. Schmitt, M. Herbold, F. Peters, Methodentwicklung im forensisch-toxikologischen Labor. Auswertung von Validierungsdaten nach den Richtlinien der GfTCh mit VALSTAT, Arvecon, Walkdorf, 2009.
- [21] E.M. Reichardt, Validation of Oral Fluid as a Matrix for Drug Detection – Thesis Bournemouth University, (2014). (Accessed 15 July 2018) http://eprints.bournemouth.ac.uk/21492/1/Reichardt%20CVa%20M_S20PhD_2014.pdf.
- [22] L. Tsanakis, J.F. Wicks, Patterns in drug use in the United Kingdom as revealed through analysis of hair in a large population sample, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 121–128.
- [23] E. Cognard, S. Rudaz, S. Bouchonnet, C. Staub, Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography–mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 826 (2005) 17–25.
- [24] A.M. Pego, F.L. Roveri, R.Y. Kuminari, V. Leyton, L.D. Miziara, M. Yonamine, Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), *Forensic Sci. Int.* 274 (2017) 83–90.

Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of “paco” (coca paste) by hair analysis. A study about possibilities and limitations. (RESUMEN TIAFT BOCA RATON-2019)

Rubio NC¹; Krumbiegel F²; Thurmann D.²; Nagel A.²; Aranguren M.³; Gorlelo JC.³; Poliansky N.³; Pragst, F².

¹Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina.

²Institute of Legal Medicine, University Medicine Charité, Berlin, Germany.

³Fundación Convivir, Buenos Aires. Argentina

INTRODUCTION: It was shown in a previous study that hair analysis is a suitable way to discriminate between coca chewers and consumers of manufactured cocaine using hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) as markers of original coca leaves (Rubio et al., Int. J. Legal Med 2014).

OBJECTIVE: In the present study it was examined whether CUS and HYG in hair are sufficiently sensitive for detecting occasional chewers of coca leaves or drinkers of coca tea, whether CUS and HYG appear in hair of “PACO” consumers (smoke coca paste waste) from Argentina, and whether anhydroecgonine methyl ester (AEME) is useful as a coca smoking marker in this context.

METHOD: Three groups were included: (a) Six volunteers from Buenos Aires who only occasionally chew coca leaves or drink a cup of coca tea (one or two times per month), (b) four volunteers with daily consumption of coca leaves, and (c) twenty-one 18 to 44 year old consumers of “PACO” in treatment for addiction. The scalp hair samples (1-4 segments of 6 cm or whole length below 6 cm) were analyzed by a validated LC-MS/MS method for cocaine (COC), benzoylecgonine (BE); ecgonine methyl ester (EME), cocaethylene (CE), trans-cinnamoylcocaine (tr CIN), tropacocaine (TRO), Norcocaine (NC), m-hydroxybenzoylecgonine (m-OH-BE), AEME, CUS and HYG.

RESULTS: Group (a): only traces of COC were found in hair of the six occasional users of coca leaves or coca tea (0.010-0.039 ng/mg). (b) For the four regular chewers of coca leaves all compounds were detected with the exception of TRO. The hair samples of group (c) contained much higher concentrations of COC (0.027-341 ng/mg, mean 37.4 ng/mg) and its metabolites. CUS was not found in these cases but traces of HYG were seen in 2.9% of the tested hair segments. AEME as a generally supposed marker for coca smoking was detected in most of these samples. However, since AEME was also found in hair of three regular coca chewers and in the extract of coca leaves, its use for differentiation between the consumer groups seems to be limited.

KEY WORD: Anhydroecgonine methyl ester, chewing coca leaves, cuscohygrine, hygrine, paco smoking.

smoking.

Rubio N.C.¹; Krumbiegel F.²; Thurmman D.²; Nagel A.²; Aranguren M.³; Gortelo J.C.³; Poliansky N.³; Pragst, F.²

Rubio N.C.¹; Krumbiegel F.²; Thurmman D.²; Nagel A.²; Aranguren M.³; Gortelo J.C.³; Poliansky N.³; Pragst, F.²

- Whether CUS and HYG are detectable in hair of occasional chewers of coca leaves or drinkers of coca tea,
- Whether CUS and HYG appear in hair of "PACO" consumers (smoke coca paste waste) from Argentina, and
- Whether anhydroecgonine methyl ester (AEME) is useful as a cocaine smoking marker in this context.

Investigated hair length: 1-4 segments of 6 cm or whole length below 6 cm

- 1▶ 6 occasional coca chewers or coca tea drinkers (1-2x per month)

Volunteer	Age/ gender	Consumption level	Ref. avg. mg/dL	OCCASIONAL COCA CERELES DE COCA TEA DRINKERS								
				COC mg/dL	MC mg/dL	EMG mg/dL	CMG mg/dL	CLG mg/dL	HYG mg/dL	CH mg/dL	THG mg/dL	
C001	20m	4-6/mo	3	0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C002	28F	Tea, always	3	0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C003	36m	20-30/mo	3	0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C004	30m	1-2/week	1	0.00	n.d.	0.07	0.02	n.d.	0.03	n.d.	n.d.	n.d.
C005	27m	6-8/mo	1	0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C006	30m	10-15/mo	1	0.00	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	n.d.	n.d.	n.d.

CO₂ and H₂O were not detected in bulk samples of consumers of less or more than 100 g in 10 min per breath with a CO₂ concentration ± 0.1 ppm.

DAILY OR ALMOST DAILY CHEWING OF COCA LEAVES, NO SMOKING OF PACO

[illegible]

* CLS and/or HPS were detected in four of eight clusters with CLC concentrations of a 0.5 mg/m³

• Aflatoxin, a mycotoxic carcinogenic degradation product, was also detected in hair of crabs chewers without smoking.

PACO SMOKERS IN WITHDRAWAL TREATMENT

[illegible]

- The cocaine smoking marker AZME was detected in all samples with COC concentrations > 1 ng/mg

* CUS was generally not found. The traces of MYO in some samples are likely to be residues from cisco leaves in PACO.

- 21 CUS and HYG were not suitable to detect people who consume coca tea or chew coca leaves up to two times per month with CUS ≤ 0.1 ng/mg in hair.

30 mg hair, decontamination with water and acetone, cutting to pieces. Deuterated standards: 5 μ l of each 1 ng/ μ l COC-d3, NC-d3, BE-d3 and EME-d3. Extraction by 2x 18 h incubation with each 0.5 ml of a mixture of methanol /acetonitrile/ 2 mM ammonium formate (25:25:50, v/v/v) at 37 °C. Evaporation of organic solvents, injection of 5 μ l for LC-MS/MS.

Instrument: Agilent 190 Infinity LC / Agilent Triple quadrupole QQQ 6460.
Column: 250 HILIC 2,1x100 mm, 2.7 μ m
Mobile Phase: A HCOONa/HCOOH in Acetonitrile LC-MS grade
Gradient: (linear, min./min.) 0.8/3.3, 3.3/5.3, 5.3/10.0, 10.0/5.3, 15.8/0.3
Tested Substances: Cocaine (CO), Norcocaine (NC), Benzoylcocaine (BE), tri-methylbenzoylcocaine (tri-MB), Ecgonine methyl ester (EME), Anhydroecgonine methyl ester (ANME), Cocaine, Cocaine base, Cocaine hydrochloride (CH), Transcocaecine (TR), Cuscutyphrine (CU) and Tyrosine (TYG).
Validation: Full validation according to international guidelines.
 LODs: 1.5 ng/ml for all analytes.



Analysis of coca leaves (4 samples) and coca tea (3 samples) for AEME [2]

- AEME (= methylcgonidine) was unambiguously detected in coca leaves and coca tea. Concentrations: 0.029–0.088 mg/g (1.4–3.1% of COC content).

19. K.C. Rubin, M. Huestig, J. Gonzalez, F. Parga, Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including tygline, corticosterone, cinnamylcaine and cocaine metabolite/cocaine ratios, *Int. J. Legal Med.* 129 (2015) 43–49.

20. J. Kirsch, Detection of cocaine abuse in state hair and human specimens to prove the consumption of natural coca products from EL-CAFAR, Research thesis, Institute of Legal Medicine Berlin 2018.

21. J. Kirsch, T. L. Colby, *Alkaloid Content of the Seeds from *Erythroxylon coca* (Coca) Products*, *Sci. J. Forensic Sci.* 50 (2005) 1–9.

22. H.J.A. Zuurmond, K. Steenra, R.P. Lijphart, M. Solenk, A. Haverkamp, Analysis of *Erythroxylon coca* (Cocaine-producing plant) products from South America, *Arch. Toxicol.* 69 (2000) 819–820.

CAN THE USE OF ALKALINE SUBSTANCE DURING CHEWING COCA LEAVES CHANGE THE DISTRIBUTION OF ALKALOIDS OF COCAINE IN HAIR?

N.C. RUBIO; M. HASTEDT; J. GONZALEZ; F. PRAGST. (RESUMEN TIAFT BS.AS. 2014)

Aims: The coca leaf is a symbol of Andean culture. The coca leaves are Schedule II controlled substances in USA but chewing coca leaves are not illegal in Argentina contrary to use of any form of manufactured cocaine. Some people use during chewing coca leaves alkaline substances (Ilipta, bicarbonate powder). In this study, hair analysis was applied for investigation of the distribution of coca alkaloids and metabolites among people who chew coca leaves with and without alkaline substance and in comparison, with German cocaine users

Methods: Hair samples from 18 Argentinean coca chewers with alkaline substance (CC_alk), 5 Argentinean coca chewers without alkaline substance (CC_s_alk) and 22 German cocaine users (Coc_us) were analyzed for cocaine (COC), cinnamoylcocaine (CIN), tropococaine (TRO), cuscohygrine (CUS) and hygrine (HYG) and the cocaine metabolites norcocaine (NC), benzoylecgonine (BE), Ecgonine methyl ester (EME) and cocaethylene (CE) by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in combination with triplequad mass spectrometry (QQQ-MS) and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (QTOF-MS).

Results: Concentration in hair ((ng/mg):

		COC	NC	BE	CE	CIN	TRO	CUS	EME
Coc_us	mean	10.551	0.227	3.434	0.069	0.432	0.101	0.072	0.001
	range	0.38-38.7	0.004-1.14	0-29.6	0-2.7	0-0.63	0-0.78	0-0.19	0.002-0.32
CC_alk	mean	23.566	0.359	9.842	4.150	2.152	0.040	0.664	1.076
	range	1.39-60.1	0.015-1.15	1.25-32	0.006-13.8	0.1-11.4	0.002-0.16	0.032-3.168	0.034-5.6
CC_s_alk	mean	1.533	0.038	0.615	0.010	0.068	0.003	0.115	0.145
	range	0.085-4.3	0.003-0.1	0.046-1.49	0-0.029	0.005-0.18	0.002-0.005	0.028-0.26	0.014-0.36

The Log(10) concentrations of the coca alkaloids and the metabolites in absolute values were statistically compared between the groups. By analysis of Student t-test significant differences were found ($\alpha=0.000-0.02$) for: (a) CC_alk vs CC_s_alk: COC, BE, EME, NC, CIN, TRO, CE; (b) CC_alk vs Coc_us: COC, BE, EME, CIN, CE, CUS and (c) CC_s_alk vs Coc_us: COC, BE, CUS. In lack of a reference substance, only qualitative data were obtained for HYG

Conclusions: The distribution of alkaloids of coca leaves and metabolites between CC_alk and CC_s_alk in hair have significant statistically differences in all the substances with the exception of the CUS. The distribution of alkaloids of coca leaves and metabolites of CC_s_alk is more similar to Coc_us. The use of alkaline substances during chewing enables a more efficient extraction of alkaloids from the leaves.

Key word: Coca chewer, hair analysis, hygrine, cuscohygrine.

Can the use of alkaline substance during chewing coca leaves

CHANGE THE DISTRIBUTION OF ALKALOIDS OF COCAINE IN HAIR?

N.C. RUBIO¹, M. HASTEDT², J. GONZALEZ², F. PRAGST²

¹ Forensic Toxicology Laboratory-Cipolletti-RN-Patagonia-Argentina- cristinarubio2@gmail.com

² Institute of Legal Medicine, University Medicine Charité- Berlin- Germany- fritz.pragst@charite.de

Introduction

The coca leaf is a symbol of Andean culture. The coca leaves are controlled substances in many country but chewing coca leaves is not illegal in Argentina contrary to use of any form of manufactured cocaine. Some people use alkaline substances (lilpa, bicarbonate powder) during chewing coca leaves.

Aims

Hair analysis was applied for investigation of the distribution of coca alkaloids and metabolites among people who **chew coca leaves with and without alkaline substance and in comparison with German cocaine users** in absolute values and cocaine ratios.

- ▶ Coca alkaloids: cocaine (COC), ecgonine methyl ester (EME), cinnamoylcocaine (CIN), tropococaine (TRO), cuscohygrine (CUS) and hygrine (HYG)
- ▶ Cocaine metabolites norcocaine (NC), benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME) and cocaethylene (CE).

Methods

Liquid Chromatography

▶ Ms/Ms Agilent 1290 infinity

LC/Agilent 6460 QQQ

▶ Hybrid QTOF-MS Agilent 6530

• Column: Poroshell 120 HILIC, 2.1x100 mm,

2.7 µm, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany

• Mobile phase A: ammonium formate buffer

pH4.2; Mobile phase B: acetonitrile.

Samples

Hair samples from

▶ 18 Argentinean coca

chewers with alkaline substance (CC_alk),

▶ 5 Argentinean coca chewers without alkaline substance (CC_s_alk)

▶ 22 German cocaine users (Coc_us)

Results

A | Absolute value. Concentration in hair (ng/mg):

	COC	NC	BE	CE	CIN	TRO	CUS	EME
Coc_us mean	10.351	0.227	3.434	0.069	0.432	0.101	0.072	0.003
range	0.38-38.7	0.004-1.34	0-29.6	0-2.7	0-0.61	0-0.78	0-0.19	0.002-0.32
CC_alk mean	23.586	0.359	9.842	4.150	2.152	0.640	0.664	1.076
range	1.39-66.1	0.015-1.15	1.29-32	0.006-13.8	0.1-11.4	0.002-0.16	0.032-3.168	0.034-5.6
CC_s_alk mean	1.312	0.018	0.811	0.031	0.068	0.003	0.121	0.143
range	0.085-4.8	0.001-0.1	0.046-1.9	0-0.219	0.001-0.18	0.0002-0.005	0.038-0.26	0.014-0.36

B | Concentrations related to cocaine

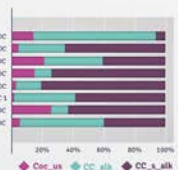
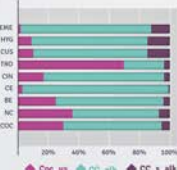
Coc_us CC_alk CC_s_alk

	mean	mean	mean
CIN/COC	0.3091	0.0145	0.0042
TRO/COC	0.0043	0.0016	0.0006
HYG/COC 1	0.0002	0.0006	0.0131
CUS/COC	0.0021	0.0400	0.1714
NC/COC	0.0218	0.0132	0.0018
BE/COC	0.2730	0.4654	0.0830
EME/COC	0.0081	0.0484	0.0218
CE/COC	0.0000	0.0629	0.0010

Student t-test ($\alpha=0.000-0.02$)

	CC_alk vs CC_s_alk	CC_alk vs Coc_us	CC_s_alk vs Coc_us
EME	yes	yes	yes
HYG	yes	yes	yes
CUS	yes	yes	yes
NC	yes	yes	yes
BE	yes	yes	yes
CE	yes	yes	yes
NC	yes	yes	yes
EME	yes	yes	yes
CUS	yes	yes	yes

12/17 was not available in a pure reference substance. Concentration calculated by area (Agilent software 2010-2011)



Student t-test ($\alpha=0.000-0.02$)

	CC_alk vs CC_s_alk	CC_alk vs Coc_us	CC_s_alk vs Coc_us
CIN/COC	yes	yes	yes
TRO/COC	yes	yes	yes
HYG/COC 1	yes	yes	yes
CUS/COC	yes	yes	yes
NC/COC	yes	yes	yes
BE/COC	yes	yes	yes
EME/COC	yes	yes	yes
CE/COC	yes	yes	yes

12/17 was not available in a pure reference substance. Concentration calculated by area (Agilent software 2010-2011) (COC, CE)

Conclusion

• In absolute concentrations the distribution of alkaloids of coca leaves and metabolites between CC_alk and CC_s_alk in hair has statistically significant differences in all the substances with the exception of the CUS.

• The use of alkaline substances during chewing enables a more efficient extraction of alkaloids from the leaves by formation of the free bases.

• The alkaloid/cocaine ratios of TRO, CUS and EME in hair are statistically higher for CC_s_alk than for CC_alk since the extraction of cocaine is obviously more improved by the alkaline substance than of these alkaloids.

• These are preliminary conclusions. Further investigations are necessary with more samples.

6.6 GRUPO D: ESTUDIOS REALIZADOS EN FLUIDO ORAL.

El fluido oral tiene gran aplicación en los controles y accidentes. Es también una matriz empleada en los controles laborales y en las fuerzas de seguridad, por lo que demostrar que en el fluido oral podemos detectar a la higrina y cuscohigrina fue uno de los ejes de nuestros estudios, sea por un real uso de hojas de coca o por emplear el mascado de hojas de coca o el té de coca como una excusa ante un resultado positivo de cocaína.

6.6.1 Desarrollo de un método para determinar la presencia de higrina y cuscohigrina en fluido oral.

Como en orina y pelo no había antecedentes de la medición de estos dos alcaloides en fluido oral, por lo que se desarrolló un método por LCMSMS previa separación de los analitos a investigar por precipitación por proteínas (Journal of Analytical Toxicology, 2018;1–7 doi: 10.1093/jat/bky076).

El método validado en fluido oral no solo permitió medir higrina y cuscohigrina, sino otros alcaloides de la hoja como cinamoilcocaína (CIN), tropococaína (TRO), ecgoninametil éster (EME), anhidroecgonina metil éster (AEME), cocaína (COC) y su metabolito benzoilecgonina (BE). No se hallaron reportes en la bibliografía de métodos en fluido oral diseñados para medir el contenido de cocaína y/o sus metabolitos y otros alcaloides de la hoja de coca en individuos que mascaran hojas de coca.

Los detalles analíticos fueron descritos en el *Capítulo 5, sección 5.3.3*.

6.6.2 Posibilidad de diferenciar a mscadores de hojas de coca y tomadores de té de coca de consumidores de cocaína a través del fluido oral.

En nuestros preliminares resultados que fueron publicados en un Journal of Analytical Toxicology, 2018;1–7 doi: 10.1093/jat/bky076 y en un Acta Toxicol. Argent. (2019) 27 (2): 72-80, la higrina y cuscohi-

grina resultaron ser marcadores satisfactorios para detectar al mascarador de hojas de coca o bebedor de té de coca. Al ser dos alcaloides más hidrosolubles que la cocaína permanecen por más tiempo en el fluido oral, negativizándose o no detectándoselos cuando la cocaína y/o la benzoilecgonina están por debajo de los valores cut-off propuestos por las guías internacionales para fluido oral con propósitos de screening (15 a 20 ng/mL) y de confirmación (8 a 10 ng/mL) (SAMHSA 2015; EWDTS 2015; Logan y col.2018).

Además, la higrina y cuscohigrina no estuvieron presentes en muestras de fluido oral de consumidores de cocaína.

No se detectó la presencia de tropococaína y anhidroecgonina metil éster en los dos voluntarios que consumieron hojas de coca (mascado o bebieron té de coca) posiblemente el método empleado no tuvo suficiente sensibilidad (límite de detección 5ng/mL).



Article

Development of a Reliable Method for Assessing Coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC–MS–MS

Nelida Cristina Rubio^{1,2,*}, Pilar Bermejo-Barrera², Ana Maria Bermejo³, and Antonio Moreda-Piñeiro²

¹San Martín 565 Cipolletti AR, Latoquil, ²Universidade de Santiago de Compostela, Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, Santiago de Compostela, ES 15782, Spain, and

³Universidade de Santiago de Compostela, Department of Pathologic Anatomy and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, Rúa de San Francisco, s/n. 15782 Santiago de Compostela, Spain

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: cristinarubio2@gmail.com

Abstract

A reliable method based on high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry has been developed for the assessment of coca alkaloids/metabolites [cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), cocaethylene (CE), ecgonine methyl ester (EME), anhydroecgonine methyl ester (AEME), tropococaine (TRO), transcinnamoylcocaine (trCIN), cuscohygrine (CUS) and hygrine (HYG)] in oral fluid samples from cocaine abusers and from coca leaves consumers (coca leaves chewers and coca tea drinkers). Oral fluid samples were collected by the passive drool technique (spitting), and after centrifugation the supernatant was treated for protein removal by adding acidified acetonitrile. The developed method was fully validated according to the international criteria and good results have been obtained (intraday and inter-day precisions were lower than $\pm 20\%$, intraday and inter day accuracy was within the 75–116% range, and LODs/LOQs was lower and close to cut-off values for COC and BE). The proposed method has been successfully applied to oral fluid samples from cocaine abusers, and also from coca leave chewers and coca tea drinkers. CUS and HYG were only found in oral fluid from people who chewed coca leaves and drank coca tea and were not detected in cocaine abusers. Both CUS and HYG could be good markers in oral fluid for distinguishing people who consume coca leaves legally (coca leave chewers and coca tea drinkers) from those who consume illegal cocaine.

Introduction

Oral fluid is an alternative forensic sample for monitoring drugs of abuse. Developments have been performed in clinical toxicology, criminal justice, for drugs of abuse testing in the workplace, and in driving under the influence of drugs (DUID) programs. Coca leave chewing and coca leave consumption as coca tea are legal practices in countries like Argentina (1). Analytical approaches allowing for the discrimination between legal consumption of coca (coca leave chewing and coca tea drinking) and illegal cocaine use (sniffing, smoking or cocaine injection) are needed. The habit of consuming coca leaves is extensive and popular in Argentina, mainly in the northwest region. The differentiation between people who use coca leaves and cocaine abusers is a great challenge in Argentina that needs an urgent solution. In previous works,

two markers of coca leave chewing (hygrine, HYG; and cuscohygrine, CUS) have been proposed for screening/confirmation purposes in urine and hair (2–4). CUS and HYG exhibit different chemical properties (pK_b and $\log P_{ow}$) from COC (5). Therefore, these two alkaloids are not extracted from coca leaves when performing the clandestine production of cocaine, and they are not present in the illegal cocaine (cocaine hydrochloride) (6–8).

There are no reports regarding the presence (and also the detection/determination) of CUS and HYG in oral fluid, and there is no information regarding the usefulness of the commercially available oral fluid samplers for a further determination of these two alkaloids. The aim of the current research has been the development and validation according to international criteria (9–12) of a reliable

procedure for detecting these two potential markers (HYG and CUS) in oral fluid. In addition, attention has focused on confirming whether HYG and CUS are positive in oral fluid at the same recommended cutoff values for cocaine (COC) and benzoylecgonine (BE) proposed by international guidelines (15–20 ng/mL for screening and 8–10 ng/mL for confirmation purposes) (13–15).

Experimental

Apparatus

Determinations were carried out with a 3200 Q TRAP LC-MS-MS system (ABSciex, Concord, Canada), equipped with a Flexar FX-15 UHPLC binary chromatographic pump (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), and a Flexar UHPLC autosampler (Perkin Elmer). Analyst 1.6 software (ABSciex) was used for system control and data acquisition. MultiQuant 2.1 software (ABSciex) was used for data processing. Separations were performed with an Infinity LabPoroshell 120 Hilic (2.7 μ m, 2.10 \times 100 mm²) from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Temperature control of the column was performed with a GECKO 2000 column heater (temperature control from 30 to 80°C) from Amchro GmbH (Hattersheim, Germany). Other laboratory devices were: a Basic20 pH-meter with a glass-calomel electrode (Crison, Barcelona, Spain), a Reax 2000 mechanical stirrer (Heidolph, Kelheim, Germany), and a VLM EC1 metal block thermostat and N₂ sample concentrator from VLM (Leopoldshöhe-Grethe, Germany).

Methods

Standards and reagents

Ultrapure water 18 M Ω cm of resistivity was from a water purification device from Millipore Co. (Bedford, MA, USA). Standard solutions were prepared from stock standards (1,000 mg/L dissolved in acetonitrile) of COC, BE, CE and EME supplied by Cerilliant

(Round Rock, TX, USA). Deuterated analog stock standard solutions were prepared from cocaine-d₃ (COC-d₃) and benzoylecgonine-d₃ (BE-d₃) in acetonitrile (100 mg/L) from Cerilliant. CUS (10 mg) was from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Ontario, Canada). AEME (1,000 mg/L dissolved in acetonitrile) was from LGC (Teddington, Middlesex, UK). TRO and trCIN (20 mg) were from NMI (West Lindfield, Australia). HYG was not commercially available; it was identified based on *m/z* (precursor ion) \rightarrow *m/z* (product ion) transitions obtained after infusion of a coca leave extract and mass spectra recording. Acetonitrile, methanol and 2-propanol (LC-MS grade) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Formic acid (98%) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain), and ammonium formate (99%) was from Fluka Analytical (Steinheim, Germany). Cellulose acetate syringe filters (0.20 μ m) were from Labbox Labware S.L. (Barcelona, Spain).

Standards solutions

Three working calibration standards were prepared in acetonitrile from stock material at concentrations of 1,000,000; 2,000; 1,000 ng/mL for COC, CE, EME, trCIN, TRO, AEME, respectively. Three working calibration standards were prepared in acetonitrile from stock material at concentrations of 1,000,000; 10,000; 1,000 ng/mL for CUS. Quality controls (QC) were prepared in acetonitrile from separate stock material. A deuterated internal standard was prepared in acetonitrile from stock material at a concentration of 10,000 ng/mL. All working standards were stored at -20°C when not in use. Calibration range was done between 5 and 200 ng/mL by COC, CE, EME, trCIN, TRO, AEME and 50–1,000 ng/mL by CUS. QC samples were prepared at concentrations of 10, 50, 100 ng/mL by COC, CE, EME, trCIN, TRO, AEME and 200, 500, 800 ng/mL by CUS. Deuterated standards were added at a final concentration of 25 ng/mL (the number of deuterated standards depended on their availability in the laboratory). Figure 1 shows a chromatogram of a standard mixture at 200 ng/mL.

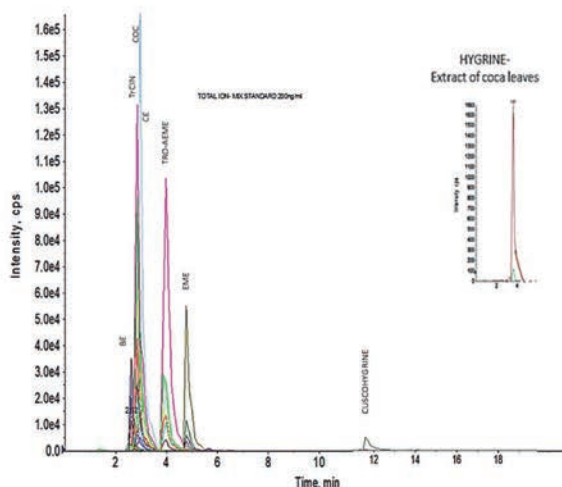


Figure 1. Mixture of the reference substances at 200 ng/mL and an extract of coca leaves (inset).

Sample preparation

Oral fluid samples were collected by passive drool technique (spitting) (16). Oral fluid samplers (collectors) were not considered due to lack of knowledge regarding stability of HYG and CUS during the sampling step with these commercial devices.

After collection, oral fluid samples were centrifuged at 10,000 rpm and 4°C for 10 min; 200 µL aliquots were then transferred to 2 mL polypropylene tubes and mixed with 10 µL of internal standards solution (500 ng/mL each). Protein precipitation was performed by adding 600 µL of mobile phase acetonitrile:20 mM ammonium formate, pH 4.2 (95:5), vortexing for 2 min, followed by centrifugation (10,000 rpm, 4°C, 10 min). Supernatants were filtered (0.45 µm) and evaporated to dryness under nitrogen at 40°C. Samples were finally reconstituted in 100 µL of the mobile phase and thoroughly vortexed before analysis.

Regarding coca leaves, 50 mg aliquots (coca leaves cut into small pieces) were mixed with 5 mL of methanol/acetonitrile/2 mM ammonium formate (25:25:50, v/v/v). The mixture was mechanically stirred for 15 min (4). The liquid phase was filtered (0.45 µm) 1:50 diluted with the mobile phase.

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry measurement

A gradient elution using 20 mM ammonium formate in ultrapure water (pH 4.2) and an acetonitrile/methanol (4:1) mixture as a mobile phase (Table I) was used for compound separation. The flow rate was set at 0.3 mL/min during the first 6 min and was then increased up to 0.5 mL/min during the following 5 min (a flow rate of 0.5 mL/min was fixed for 2 min before setting the initial flow rate and mobile phase composition, Table I). Chromatographic separations were performed at 40°C and the chromatographic time was 20 min. Retention times, listed in Table II, have shown good repeatability (RSDs lower than 2% for all analytes).

Data acquisition parameters for each multireaction monitoring mode (MRM) transition (dwell time of 150 ms for CUS, and 30 ms for the remaining compounds) are listed in Table II. At least two precursor ion→product ion transitions were monitored for each analyte (Table II) for guaranteeing the specificity of the measurements (the presence of an analyte was confirmed when all qualifier MRM transitions were identified in each chromatographic run). The MRM transitions offering the highest sensitivity were finally used for quantification purposes. Optimized ion source parameters (positive ionization) were set at 400°C for temperature, 5,000 V for voltage, 20 for curtain gas, HIGH for collision gas, 20 for ion for source gas 1 and 15 for ion for source gas 2.

Calibration

Blank oral fluids (drug-free oral fluid samples) used when preparing calibrations were obtained from several volunteers. Five different

Table I. Gradient conditions

Total time (min)	Flow rate (µL/min)	A%	B%
0.1	300.00	8.0	92.0
2.0	300.00	9.0	91.0
6.0	300.00	15.0	85.0
11.0	500.00	60.0	40.0
12.0	500.00	60.0	40.0
13.0	500.00	40.0	60.0
14.0	300.00	8.0	92.0
20.0	300.00	8.0	92.0

Mobile phase A: 20 mM ammonium formate in deionized water pH 4.2.

Mobile phase B: acetonitrile:methanol (4:1).

calibration curves (each calibration at six concentration levels) were prepared and were run in several days. COC, BE, EME, AEME, trCIN and TRO concentrations varied from 5 to 200 ng/mL. CUS concentrations were within the 50–1,000 ng/mL range. Calibration curves were set to ignore the origin and were evaluated using three curve weightings (none, $1/x$ and $1/x^2$). The analyte response to internal standard response ratio vs analyte concentration to internal standard concentration ratio was used. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were established as 3 and 10 times the signal-to-noise ratio (S/N), respectively. The limit of detection was not determined by COC, BE, TRO, trCIN, CUS or CE because the limit of quantification was considered enough for the objective of this research.

Precision–accuracy

Within-run precision and between-run precision were evaluated using oral fluid samples spiked at 10, 50 and 100 ng/mL (COC, BE, EME, TRO, trCIN, AEME and CE), and 200, 500 and 800 ng/mL (CUS), prepared/measured over three different samples per concentration over five different runs. Regarding accuracy, this parameter, based on bias, was defined as follows:

$$\text{Bias} = \frac{[X_{\text{measured}}]}{[X_{\text{reference}}]} 100$$

where $[X_{\text{measured}}]$ is the average concentration measured and $[X_{\text{reference}}]$ is the reference concentration.

Interference study

The absence of common interferences from the oral fluid matrix was established by subjecting 10 drug-free oral fluids to the proposed method (without adding internal standards) and verifying that there were no chromatographic signals at the retention time and MRM transitions for each analyte. In addition, similar experiments were performed adding internal standards (10 ng/mL) for evaluating interferences from stable-isotope internal standards.

Matrix effect (ionization suppression/enhancement)

The matrix effect (ME) was evaluated following the strategy post-extraction addition (16) as follows:

$$\text{ME}\% = 100 - \frac{B}{A} 100$$

where B is the average peak area of the analyte from the standard solution and A is the average peak area of the analyte added to the extract (oral fluid treated as described in Sample preparation section) at the same concentration.

ME was evaluated in triplicate at 10 and 100 ng/mL (COC, TRO, BE, trCIN, CE, AEME and EME), and at 200 and 800 ng/mL (CUS) concentration levels. Negative values show ion suppression; whereas, positive values mean ion enhancement.

Carryover

Carryover was evaluated by monitoring two extracts obtained from two drug-free oral fluid samples just after analyzing extracts from oral fluid samples containing the analytes at several concentrations.

Table II. MS/MS data, retention times and validation data of coca alkaloids and cocaine metabolites analyzed in oral fluid

Analyte name	Precursor ion (amu)	Product ion (amu)	ISTD	RT (min)	DP	EP	CEP	CE	CXP	R ² -weighting factor	Equation Linear range (ng/mL)	Matrix effect
BE	290.1	168.2	BE-d3	2.62	70.97	2.41	54.69	20.96	2.41	0.9917-None	$y = 0.94356x \pm 0.01788$ 5-200	-34%
	105.1	88.1			73.07	2.34	40.73	41.36	2.81			
	88.1	105.1			74.17	2.87	46.85	46.85	2.96			
CE	318.1	196.2	CE-d3	2.8	76.68	2.23	149	82.58	2.36	0.9876-None	$Y = 2.9988x \pm 0.11402$ 5-200	-53%
	105.1	57.42			55.45	5.18	11.16	25.53	2.85			
	91.1	55.54			55.33	5.15	10.29	49.89	3.41			
COC	304.1	182.2	COC-d3	2.67	55.54	5.13	12.78	52.07	2.72	0.9902-None	$Y = 1.4365x \pm 0.07990$ 5-200	-61%
	105.1	54.87			54.87	4.8	9.57	25.83	2.47			
	82	53.97			53.93	4.46	33.3	39.39	2.47			
EME	200.1	182.2	BE-d3	4.21	53.99	5.13	24.83	80.15	2.48	0.9902-None	$y = 1.37296x \pm 0.10954$ 10-200	-67%
	82.1	52.11			52.16	2.18	128	21.96	2.47			
	67.1	52.66			52.66	2.18	10.86	31.21	2.48			
trCIN	330.2	182.1	BE-d3	2.64	52.78	2.14	11.92	79.33	5.46	0.9905-None	$y = 2.59806x \pm 0.15914$ 5-200	-74%
	77.1	53.35			53.35	5.2	31.38	91.87	2.42			
	103.1	52.91			52.91	5.4	33.15	31.17	2.32			
TRO	246.1	124.1	BE-d3	3.75	53.06	5.32	12.28	62.24	2.46	0.9903-None	$y = 6.12196x \pm 0.07189$ 5-200	-59%
	77.1	53.18			53.18	4.26	23.66	125.39	2.19			
	67.1	53.95			53.95	3.9	24.51	26.22	3.48			
CUS	225.1	184.1	BE-d3	11.65	53.86	3.93	10.28	71.67	10.92	0.9928-1/x	$y = 0.5990x \pm 0.34813$ 50-1,000	13%
	42.1	53.25			53.25	3.85	12.88	51.87	2.5			
	51.1	53.8			53.8	3.96	30.4	107.44	2.28			
HYG	142.1	84.1	BE-d3	3.76	49.52	2.17	20.07	23.94	2.68	0.9952-None	$y = 0.86307x \pm 0.01154$ 10-200	-59%
	42.1	49.52			49.52	2.17	20.07	23.94	2.68			
	182	122			70	10	9.71	77.64	4.71			
AEME	293.1	177.2	BE-d3	2.62	63.92	4.03	11.97	19.72	2.89	0.9952-None	$y = 0.86307x \pm 0.01154$ 10-200	-59%
	65	64.92			64.92	5.09	6.08	52.06	6.08			
	77	50.03			50.03	5.13	2.68	33.25	3.5			
BE d3	293.1	177.2	BE-d3	2.62	49.13	4.25	9.14	50.76	2.83	0.9952-None	$y = 0.86307x \pm 0.01154$ 10-200	-59%
	65	64.92			64.92	5.09	6.08	52.06	6.08			
	77	50.03			50.03	5.13	2.68	33.25	3.5			
COC d3	307.1	185.1	BE-d3	2.81	71.79	2.34	9.12	26.36	2.84	0.9952-None	$y = 0.86307x \pm 0.01154$ 10-200	-59%
	85.1	54.82			54.82	5.04	9.11	25.86	2.48			
	199.2	46.17			46.17	7.73	15.73	28.89	6.31			
CE d3	321.2	94.1		2.82	45.19	3.97	13.94	44.1	2.79			

Anu = atomic mass unit; ISTD = internal standard; RT = retention time; DP = declustering potential; EP = entrance potential; CEP = collision cell entrance potential; CE = collision energy; CXP = cell exit potential.

Sample stability

Analyte stability may be affected by several factors such as storage conditions and sample processing. Freeze/thaw conditions were tested analyzing an oral fluid sample spiked at three concentration levels after two freeze and thaw cycles. In addition, short-term stability (extracted analyte losses when samples are in the autosampler just before analysis) was also investigated by reinjecting and analyzing the same extracts after 24 h (7°C inside the autosampler). Concentrations outside tolerable limits of $\pm 20\%$ could show analyte instability.

Applicability

Applicability of the proposed method was demonstrated by analyzing five oral fluid samples from cocaine abusers (samples provided from the Toxicology Laboratory—USC) and identified as C1–C5; four oral fluid samples from a volunteer who chewed coca leaves (samples coded as CC1h to CC13.5 h); and three oral fluid samples from a volunteer who drank coca tea (samples coded as CT30 min to CT2 h). Two oral fluids (drug-free oral fluids) from coca leave chewing and coca tea drinking volunteers taken prior to chewing coca leaves or drinking coca tea (coded as CC0 h and CT0 h, respectively) were also included.

Table III. Precision and accuracy

Analyte name	Precision interday (%)			Accuracy (%)		
	QC1	QC2	QC3	QC1	QC2	QC3
COC	14.6	10.8	9.94	107.9	94.8	101.5
BE	22.0	14.9	10.96	106.9	99.9	96.4
EME2	16.2	7.9	17.1	116.1	99.9	94.1
CE	11.5	8.3	9.7	102.2	94.9	86.5
trCIN	14.7	12.3	12.2	110.9	101.4	89.0
AEME	21.2	9.2	14.6	98.3	97.2	100.6
TRO	22.4	12.1	15.5	98.4	113.9	100.1
CUS ^a	16.6	8.9	7.5	75.3	99.1	96.7
HYG	–	–	–	–	–	–

QC1 = 10 ng/mL; QC2 = 50 ng/mL; QC3 = 100 ng/mL.

^aQC1 = 200 ng/mL; QC2 = 500 ng/mL; QC3 = 800 ng/mL.

Table IV. Results of case studies

	COC	BE	CE	EME	TRO	CIN	AEME	CUS	HYG
	ng/mL								
C1	46.2	141.9	nd	131.8	nd	nd	nd	nd	nd
C2	55.2	64.2	nd	33.5	nd	nd	nd	nd	nd
C3	253.4	71.0	nd	19.4	nd	6.6	nd	nd	nd
C4	12.8	20.4	nd	11.3	nd	7.9	nd	nd	nd
C5	124.7	150.8	nd	18.1	nd	nd	nd	nd	nd
CC0 h	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CC1 h	152.5	59.6	nd	89.8	nd	18.7	nd	336.4	Positive
CC6 h	16.0	22.8	nd	26.4	nd	nd	nd	115.4	Positive
CC9.5 h	11.3	44.5	nd	33.8	nd	nd	nd	125.6	Positive
CC13.5 h	nd	7.6	nd	6.5 ^a	nd	nd	nd	52.5	Positive
CT0 h	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
CT30 min	67.8	9.9	nd	9.8	nd	7.5	nd	43.7 ^a	Positive
CT1 h	19.1	15.3	nd	8.1 ^a	nd	nd	nd	39.7 ^a	Positive

C = five different consumers.

CC0 h, CC1 h, CC6 h, CC9.5 h, chewing coca samples taken from one donor at different times.

CT0 h, CT30 min, CT1 h, drink coca tea samples taken from one donor at different times.

HYG: it was considered positive when the signal meets the requirements quoted in LC condition and MS–MS condition.

^aBelow calibration range.

Results and Discussion**Method validation**

Validation has been established following recommendations for assessing drug-impaired driving cases and workplace drug testing (13–15). Cutoffs for screening and confirmation in oral fluid were established at 20 and 8 ng/mL (COC, BE, CE). Regarding the other analytes (EME, TRO, trCIN, AEME), there are no recommendations/cutoff values, and the same criteria as for COC, BE and CE were used.

Calibrations were fit to a quadratic curve model (this is expected when the calibration range is not spanning more than one order of magnitude) (9), but the CUS calibration curve was 1/x weighted. The coefficients of determination (R^2) were higher than 0.9900, except for CE (0.9876) (Table II).

The LOQ was established at 5 ng/mL for COC, BE, trCIN and CE; 10 ng/mL for EME and AEME; and 50 ng/mL for CUS. The LOD was established at 5 ng/mL for EME and AEME. The LOD was not determined for COC, BE, CUS and trCIN because the LOQ was enough to assess the aims of the proposed method (Table II).

The intraday and interday precision for all analytes (Table III) were within the acceptable limits ($\pm 20\%$ error), except for BE, TRO and AEME at a concentration of 10 ng/mL (value close to 22%). We have accepted this error because TRO and AEME are not important analytes when assessing cocaine abuse, or when analyzing samples from coca leave chewers and coca tea drinkers. In addition, the value of 10 ng/mL is lower than the cutoff values for screening purposes of other important analytes (20 ng/mL for BE). The accuracy of the assay was acceptable, within 20–25% of the target value (bias within the 75–116% range).

No significant matrix or internal standard interferences were observed when analyzing the 10 drug-free oral fluid samples.

Carryover was detected for COC after injecting extracts spiked at 50 ng/mL, and for CUS after spiked oral fluids at 1,000 ng/mL. Regarding other analytes, carryover was significant after spiked concentrations of 200 ng/mL. In addition, two blank matrix samples were needed to avoid COC and BE carryover, and two blanks after each oral fluid analysis were therefore carried out. Moreover, the autosampler was set to clean the injector's needle four times before

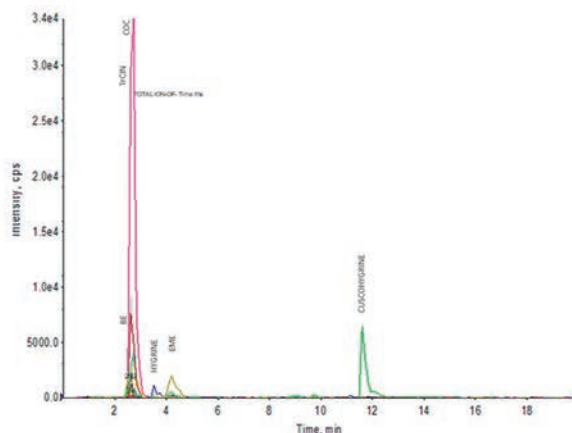


Figure 2. Oral fluid extract of the coca chewer after 1 h.

injection, and another four times after sample injection (2-propanol was used for injector needle rinsing).

The method used for sample preparation by centrifugation/protein precipitation plus the sample preconcentration and ESI ion source is the least favorable technique from the point of view of ME (17). Calculated ME (Table II) was found to be independent of the concentration level tested and varied from -62 to $+13\%$. Ion suppression has not affected the LOQ of the method.

Regarding sample stability, samples were found to be stable after two freeze/thaw cycles, and also after 24 h at 7°C in the autosampler (concentrations for all analytes were within the $\pm 20\%$ range).

Application

Applicability of the proposed method was demonstrated by analyzing oral fluid samples from cocaine abusers and also from volunteers who chewed coca leaves and drank coca tea. Table IV lists the concentration of all analytes in the oral fluid samples. Figure 2 shows a chromatogram of an oral fluid sample from a coca leave chewer.

Conclusions

This method is the first approach for performing a differentiation by oral fluid analysis between cocaine abusers and people who consume coca leaves (chewing or drinking coca tea). The aim of the current work is the detection/determination of CUS and HYG (two coca leaf alkaloids that are not present in cocaine) in oral fluid from coca leave chewers and coca tea drinkers. CUS and HYG concentrations disappear at the same time as COC in oral fluid, while CUS and HYG are positive at concentrations of COC and BE of 20 and 8 ng/mL. Oral fluid would therefore be a potential forensic sample for certifying recent coca leave use, although we cannot assure if illicit cocaine was consumed at the same time.

CUS and HYG were negative in oral fluid samples from cocaine abusers but were positive in all oral fluid samples from volunteers

who chewed coca leaves or drank coca tea. In addition, CUS and HYG were detectable even when COC and BE concentrations were lower than the recommended cutoff concentrations (screening and confirmation) in DRUID. CUS and HYG could therefore be promising markers for distinguishing cocaine abusers from coca leave chewers and coca tea drinkers.

EME is a COC metabolite and also an alkaloid present in coca leaves. EME was found to be positive in almost all oral fluid samples (cocaine abusers and coca leave/coca tea consumers). Another alkaloid present in coca leaves, trCIN, could be present or not in illegal cocaine (the presence depends on the amount of potassium permanganate used when preparing illegal cocaine) (18). Therefore, trCIN detection is not always possible in samples from cocaine abusers. Regarding coca consumers, trCIN was only detected in oral fluids sampled right after coca leave consumption. These findings contrast to data in urine and hair from coca leave consumers (longer detection window) (2–4). TRO and AEME (a marker of cocaine smoking) are other alkaloids present at low concentrations in coca leaves (19, 20). These alkaloids were not found in all analyzed samples.

The proposed method is a first approach to distinguish between cocaine abusers and coca leave consumers. However, further research is needed to reduce the ME and improve sensitivity for TRO, AEME and trCIN detection. Improved sample preparation methods, such as microextraction techniques, could be useful approaches for reaching these aims. Although oral fluid collection without specialized sampling devices (as used in the current development) can be useful from a scientific perspective, commercialized oral fluid samplers (collectors) could be evaluated for ensuring the integrity of these alkaloids during oral fluid sampling.

Funding

The authors are grateful for the financial support provided by the Dirección Xeral de I + D—Xunta de Galicia (Project number 6RC2014/2016 Grupos de

Referencia Competitiva) and European Regional Development Fund (FEDER) Project number GPC2014/035.

Compliance with ethical standards

The authors declare that the studies have been approved by the Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia (registration code CEIC de Galicia 2010/372). The approved document by the CEIC de Galicia requires an informed consent from all volunteers who participated in the study. The authors declare therefore that all volunteers have signed an informed consent for allowing the use of the provided oral fluid and urine samples in this study.

References

- (1989) Argentine Federal Law 23737, art.15. O.B. October 10, 1989. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/0-4999/138/teact.htm>. (accessed January 15, 2018).
- Rubio, N.C., Strano-Rossi, S., Tabernero, M.J., Anzillotti, L., Chiarotti, M., Bermejo, A.M. (2013) Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Science International*, 227, 60–63.
- Rubio, N.C., Strano-Rossi, S., Tabernero, M.J., González, J.L., Anzillotti, L., Chiarotti, M., et al. (2014) Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. *Forensic Science International*, 243, 30–34.
- Rubio, N.C., Hastedt, M., Gonzalez, J., Pragst, F. (2014) Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. *International Journal of Legal Medicine*, 129, 69–84.
- Drager, B. (2002) Review analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*, 978, 1–35.
- Rubio, N.C., Thurmann, D., Krumbiegel, F., Pragst, F. (2017) Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast to cocaine abuse. *Drug Test and Analysis*, 9, 323–326.
- Rubio, N.C., Marquez, C., Confalonieri, A., Castiglione, J.L. (2015) La eliminación de la higrina y cuscohigrina en las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascaradores de hoja de coca de consumidores de cocaína. Poster, TIAFF, Peru.
- Casale, J.F., Klein, R.F.X. (1993) Illicit production of cocaine. *Forensic Science Review*, 5, 95–107.
- Peters, F., Drummer, O., Musshoff, F. (2007) New validation method. *Forensic Science International*, 165, 216–224.
- Krueve, A., Rebanc, R., Kipper, K., Oldenkop, M.L., Evard, H., Herodes, K., et al. (2015) Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870, 29–44.
- Krueve, A., Rebanc, R., Kipper, K., Oldenkop, M.L., Evard, H., Herodes, K., et al. (2015) Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, 870, 8–28.
- Scientific Working Group for Forensic Toxicology. (2013) Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 37, 452–474.
- (2015) Proposed Revisions to Mandatory Guidelines for Federal Workplace Drug Testing Programs-Oral Fluid. Federal Register, 80 FR 28053-2015 Version. Department of Health and Human Services, SAMHSA. <https://www.federalregister.gov/documents/2015/05/15/2015-11523/mandatory-guidelines-for-federal-workplace-drug-testing-programs>. (accessed January 15, 2018).
- (2015) European Guidelines for Workplace in Oral Fluid—2015 Version 02, European Workplace Drug Testing Society. <http://www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-oral-fluid-2015-05-29-v02.pdf> (accessed January 15, 2018).
- Logan, B.K., D'Orazio, A.L., Mohr, A.L., Limoges, J.F., Miles, A.K., Scarneo, C.E., et al. (2018) Recommendations for toxicological investigation of drug-impaired driving and motor vehicle fatalities—2017 update. *Journal of Analytical Toxicology*, 42, 63–68.
- Bosker, W.M., Huestis, M.A. (2009) Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clinical Chemistry*, 55, 1910–1931.
- Truffelli, H., Palma, P., Famigliini, G., Cappiello, A. (2011) An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 30, 491–509.
- (2012) Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials, Vienna, ST/NAR/7/Version1. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_Manual_Rev_1.pdf. (accessed March 3, 2018).
- Zuanazzi, J.A.S., Trenea, V., Limberger, R., Sobral, M., Henriques, A.T. (2001) Alkaloids of Erythroxylum (Erythroxylaceae) species from Southern Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 819–825.
- Novak, M., Saleminik, C.A., Khan, I. (1984) Biological activity of the alkaloids of Erythroxylum Coca and Erythroxylum Novogranatense. *Journal of Ethnopharmacology*, 10, 261–274.

COMUNICACIONES BREVES

Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar
Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Preliminary study

Rubio, Nélida Cristina¹; Moreda-Piñeiro A.²; Bermejo-Barrera P.²; Bermejo A.M.³

¹Laboratorio de Toxicología y Química Legal (LATOQUIL). Cipolletti, Río Negro. Patagonia. Argentina. ²Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela - España. ³Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" (INCIFOR), Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela. Rúa de San Francisco, s/n.15782. Santiago de Compostela - España. *cristinarubio2@gmail.com

Recibido: 16 de marzo de 2019

Aceptado: 5 de junio de 2019

Resumen. Actualmente el fluido oral (FO) es aceptado como una matriz biológica alternativa para detectar drogas en toxicología clínica y forense. En países como Argentina donde el uso de hojas de coca (mascar hojas de coca o beber té de coca) es legal son necesarios procedimientos adecuados para lograr una clara diferenciación entre los individuos que usan las hojas de coca de manera legal de aquéllos que usan cocaína en forma ilegal. Poca es la información que hay en la literatura sobre el perfil de los alcaloides de la hoja de coca en FO de personas que mascan hojas de coca o toman té de coca y hasta el presente trabajo no se hallaron datos sobre el perfil en FO de la higrina (HIG) y cuscohigrina (CUS). De este estudio preliminar participaron dos voluntarios. Los resultados mostraron que la CUS e HIG siguieron siendo positivas después que la cocaína (COC) y benzoilecgonina (BE) cayeron por debajo de los valores *cut-off* propuestos por las guías internacionales para FO en casos de screening (15 a 20 ng/mL) y de confirmación (8 a 10 ng/mL) en el caso del mascador de coca. En el participante que tomó una taza de té de coca, en el último punto examinado (1 h) resultó ser positivo para la COC y BE y también para la CUS e HIG. El FO podría ser una muestra útil para confirmar el uso legal de la hoja de coca, aun cuando futuros estudios son necesarios para corroborar estos primeros datos.

Palabras clave: Fluido oral; Mascadores de coca; Té de coca; Cuscohigrina; Higrina

Abstract. Nowadays oral fluid (OF) is accepted as an alternative biological sample for detecting drugs in clinical and forensic toxicology. In countries like Argentina, where the use of coca leaves (coca leaves chewing and coca tea drinking) is legal, adequate procedures are required to allow a clear differentiation between people who use coca leaves (legal practice) and those who use cocaine (illicit practice). There is scarce literature regarding coca leaf alkaloids profile in OF from people who chew coca leaves and drink coca tea. Until now, coca leaf alkaloids profile of hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) in OF were not described in the literature. The current preliminary study was performed with two healthy volunteers. In this research CUS and HYG have been found to be positive (detectable) even when cocaine (COC) and benzoylecgonine (BE) are dropped below the cut-off values proposed by international guidelines for screening (15 to 20 ng/mL), and confirmation (8 to 10 ng/mL) in OF. In addition, CUS and HYG were also found to be positive at the same time of the last detection of COC and BE after coca tea consumption. The OF would be a useful sample to confirm the legal use of coca leaf, even when more researches are therefore needed.

Keywords: Oral fluid; Coca chewers; Coca tea; Cuscohygrine; Hygrine

Introducción

En países como la Argentina, Perú o Bolivia donde mascar hojas de coca o beber té de coca es legal (Ley 23737/1989 (InfoLEG)), son necesarios procedimientos que permitan diferenciar estas prácticas legales del uso ilegal del consumo de cocaína. Se requiere, por lo tanto, en situaciones judiciales o en casos de accidentes automovilísticos, como en situaciones de controles laborales o de catástrofes donde los responsables presentan un resultado positivo de cocaína y alegan un uso legal de la hoja de coca (mascado o beber té de

coca), contar con herramientas analíticas que nos permitan una clara diferenciación de estas dos situaciones.

Recientemente dos alcaloides de la hoja de coca: higrina (HIG) y cuscohigrina (CUS), han sido propuestos como marcadores del mascado de la hoja de coca para propósitos de *screening*/confirmación en muestras de pelo y orina, con algunas limitaciones (Rubio y col. 2013; Rubio y col. 2014a; Rubio y col. 2014b). La CUS e HIG poseen diferentes propiedades químicas (pKb, y Log Po/w) que la

cocaína (COC) (Drager 2002) y, en consecuencia, la HIG y CUS, no son extraídas o si lo son, son extraídas en muy baja proporción de las hojas de coca durante el proceso de producción clandestina del clorhidrato de cocaína, razón por la cual no son detectados en las muestras de secuestro y en las muestras biológicas de quienes han consumido cocaína ilegalmente (Casale y Klein 1993; Rubio y col. 2015; Rubio y col. 2017).

Escasas son las citas bibliográficas halladas sobre el perfil metabólico y farmacocinética de la COC y de sus dos mayores metabolitos (benzoilecgonina (BE) y metilecgonina (EME)) en fluido oral (FO) de mascadores de hojas de coca o de bebedores de té de coca (Coe y col. 2018). No se han encontrado datos referentes al comportamiento de la CUS e HIG como así tampoco de otros dos alcaloides de la hoja de coca como la cinamoilcocaína (CIN) y la tropococaína (TRO) en el FO.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) establecer el perfil de los alcaloides de la hoja de coca en el FO de un voluntario que ha masticado hojas de coca y de otro que bebió té de coca. Se analizaron las concentraciones en FO de: COC y de sus dos principales metabolitos BE y EME, este último también constituyente de la hoja de coca, de CUS e HIG (propuestos como marcadores de masticado en orina y pelo) y de trCIN y TRO. 2) Determinar si la CUS e HIG son aún positivas a la concentración de *cut-off* propuesta por las guías internacionales para la COC, BE y EME en FO en casos de *Driving Under the Influence of Drug* (DUID), control de drogas de abuso en lugares laborales y otras situaciones forenses. Las guías internacionales han propuesto concentraciones para COC y BE de 15 a 20 ng/mL con propósito de *screening*, y 8 a 10 ng/mL para fines de confirmación (SAMHSA 2015; EWDTS 2015; Logan y col. 2018).

Materiales y método

Testigos, reactivos y materiales

Los testigos COC, BE, EME, cocaína- d^3 (COC- d^3), y benzoilecgonina- d^3 (BE- d^3) en concentraciones de 1000 µg/mL y 100 µg/mL fueron obtenidos de Cerilliant (Round Rock, TX, USA), CUS (10 mg) fue comprada en Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canadá). TRO y trCIN (20 mg) fue de NMI (West Lindfield, Australia). El testigo HIG no pudo ser obtenido comercialmente, por lo que la HIG fue identificada con base en su m/z (ion precursor) \rightarrow m/z (ion producto), las transiciones fueron obtenidas empleando un extracto de hojas

de coca y registrando el espectro de masa para futuras comparaciones.

Reactivos: el agua ultrapura 18 MΩcm se obtuvo de un purificador de agua Millipore CO. (Bedford, MA, USA). El acetonitrilo, metanol y 2-propanol (LC-MS grade) se compraron a Riedel-de Haën (Seelze, Germany). El ácido fórmico (98%) fue de Panreac (Barcelona, España) y el formiato de amonio (99%) fue de Fluka (Steinheim, Germany). Insumos: los filtros para jeringa de acetato de celulosa (0,20 µm) provinieron de Labbox Labware S.L. (Barcelona, España).

Instrumentación

Las determinaciones se realizaron en un sistema 3200 Q TRAP LC/MS/MS (ABSciex, Concord, Canadá), equipado con una bomba cromatográfica binaria Flexar FX-15 UHPLC (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) y un automuestreador Flexar UHPLC (Perkin Elmer). El software empleado para el control del sistema y adquisición de datos fue Analyst 1.6 (ABSciex), el procesamiento de los datos se realizó con el software MultiQuant 2.1 (ABSciex). La columna cromatográfica usada fue *Infinity LabPoroshell 120 HiliC* (2,7 µm, 2,10 × 100 mm) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Un GECKO 2000 se empleó para el control de la temperatura de la columna (30 a 80°C) de Amchro GmbH (Hattersheim, Germany). La fuente de iones con ionización por electrospray (ESI), fue operada en modo ionización positiva, a una temperatura de 400°C, 5000 V. La separación de los compuestos se realizó a 40°C y se empleó un gradiente con una fase móvil A de formiato de amonio 20 mM, pH 4,2 en agua ultrapura y una fase móvil B de acetonitrilo:metanol (4:1). El tiempo de corrida fue de 20 min.

En la *Tabla 1* se detallan para cada compuesto el ion precursor y los iones productos analizados, el modo MRM: *multi reaction monitoring*, los tiempos de retención, los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC). Se analizaron al menos dos iones producto para cada compuesto para garantizar la especificidad de la medida y la presencia de un analito fue confirmada cuando todos los iones cualificadores fueron identificados en cada corrida cromatográfica. La MRM transición de mayor respuesta fue empleada para la cuantificación.

Los rangos de cuantificación para COC, BE, trCIN y TRO estuvieron entre 5-200 ng/mL; entre 10-200 ng/mL para EME y para CUS entre 50-800 ng/mL. Detalles sobre la validación del método son descriptos en una publicación previa (Rubio y col. 2018) y en la *Tabla 1*.

Tabla 1. MS/MS, tiempos de retención, LC y LD de alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína en FO.

Compuesto	Ion precursor (amu)	Ion producto (amu)	ISTD	TR (min)	LD ng/mL	LC ng/mL
BE	290,1	168,2	BE-d ³	2,62	n/a	5
		105,1				
		77				
COC	304,1	182,2	COC-d ³	2,67	n/a	5
		105,1				
		82				
		77				
EME	200,1	182,2	BE-d ³	4,21	5	10
		82,1				
		67,1				
		41,1				
trCIN	330,2	77,1	BE-d ³	2,64	n/a	5
		182,1				
		103,1				
		51,1				
TRO	246,1	124,1	BE-d ³	3,75	n/a	5
		77,1				
		67,1				
		51,1				
CUS	225,1	84,1	BE-d ³	11,65	n/a	50
		42,1				
HIG ⁽¹⁾	142,1	84,1		3,53		
		42,1				
BE-d ³	293,1	171,2		2,62		
		77				
COC-d ³	307,1	185,1		2,81		
		85,1				

Amu: atomic mass unit; ISTD: internal standard; TR: tiempo de retención; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; n/a: no aplica, dato no calculado; ⁽¹⁾HIG no disponible comercialmente, los datos se obtuvieron de un extracto de hojas de coca.

Cuantificación

La cuantificación de la COC, BE, EME, CUS, trCIN y TRO fue realizada empleando un método validado siguiendo las guías internacionales (Rubio y col. 2018). Las muestras de FO fueron colectadas por salivación en un tubo de vidrio (*spitting*) (Bosker y Huesties 2009). No se emplearon colectores de FO comerciales debido a la falta de conocimientos sobre el comportamiento de la HIG y CUS sobre este tipo de dispositivos y no se encontraron datos en la bibliografía sobre este punto.

Después de la colección, la muestra de FO fue centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 10 min. Se tomaron 200 µL FO y fueron mezclados con 10 µL de una solución de estándar interno de 500 ng/mL (COC-d³ y BE-d³), se adicionaron 600 µL de fase móvil acetronitrilo: formiato de amonio 20 mM en agua, pH 4,2 (95:5) para precipitar las proteínas, se agitó por 2 min y se centrifugó (10000 rpm, 4°C, 10 min). EL sobrenadante fue filtrado (0,2 µm) y evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno (a 40°C). El extracto evaporado fue redisoluto en 100 µL de fase móvil y una alícuota de 20 µL fue inyectada en el LC-MS/MS.

Participantes

Dos voluntarios sanos participaron en este estudio, a quienes se les permitió desayunar previo a mascar hojas de coca o beber una taza de té de coca. Los voluntarios realizaron su rutina diaria mientras las muestras de FO fueron colectadas. No se consumieron bebidas alcohólicas durante el experimento. Ambos participantes dieron su consentimiento por escrito.

El primer voluntario mascó 5 g de hoja de coca junto con una sustancia alcalina (bicarbonato de sodio) durante aproximadamente 1 hora. Una muestra blanco de FO fue tomada antes de iniciar el mascado (-1,5 h), se inicia el mascado al tiempo -1,17 h, las hojas fueron removidas de la boca a tiempo 0 y las muestras de FO fueron tomadas a los 5 y 30 min y 1,0- 2,0- 3,5- 4,5- 6,0- 7,5- 9,5- 13,5- 23,0 y 26,0 h (detalle del procedimiento en la *Tabla 2*).

El segundo voluntario bebió una taza de té de coca comercial (un saquito de té de 1 g de hojas de coca picadas). Las muestras de FO fueron tomadas a -1,5 h antes (muestra blanco), 5 y 30 min, y 1,0- 2,0 y 3,0 h. después de la ingesta del té (detalles del procedimiento en la *Tabla 3*).

En todos los casos las muestras de FO fueron mantenidas a -20°C hasta el momento del análisis.

Resultados y discusión

Las concentraciones de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína en FO vs el tiempo después de mascar hojas de coca y de beber el té de coca se muestran en las *Tablas 2 y 3* y en las *Figuras 1 y 2*.

La alta concentración hallada a los 5 y 30 min. (0,08 y 0,5 h) en el FO del voluntario que mascó hojas de coca pudo deberse a la contaminación del FO por éstas o a una absorción local que produciría un efecto depósito de las drogas en la cavidad oral (Drummer 2006, Reichardt 2014).

En el FO del mascador de hojas de coca la relación BE/COC, EME/COC, y CUS/COC pasó de menor de 1 a mayor de 11, sugiriendo que la eliminación de la COC en el FO fue más rápida que en el caso de la BE, de la EME (Scheidweiler 2010) y de la CUS (*Tabla 4*). La relación BE/CUS y EME/CUS fue menor de 1 en todas las mediciones mostrando que tanto la CUS, BE y EME tienen una velocidad de eliminación semejante (*Tabla 4*).

EL alcaloide trCIN se detectó hasta las 3,5 h, mientras que la CUS, HIG, BE y EME se detectaron hasta las 13,5 h y la COC fue cuantificada hasta las 9,5 h (*Tabla 2*). La BE y EME fueron encontradas en el FO luego del consumo oral de cápsulas con 100 y 200 mg de COC (Coe y col. 2018), pero además debe tenerse en cuenta que la BE puede originarse por hidrólisis química de la COC por la acción de sustancias alcalinas como el bicarbonato de sodio que es empleado durante el coqueo y que la EME es también un alcaloide que forma parte de la hoja de coca. Los alcaloides de la hoja de coca son absorbidos durante el mascado a través de la mucosa oral (proceso que se ve favorecido por el empleo de sustancias alcalinas) y por el tracto gastrointestinal pero no han sido estimados aún el grado de absorción de los alcaloides de la hoja de coca en la cavidad oral como en el tracto gastrointestinal.

EL análisis de las relaciones CUS/COC, BE/COC y EME/COC en el segundo voluntario que bebió una taza de té de coca muestra que éstas se incrementan con el tiempo indicando al igual que en el caso de mascador de coca la eliminación de la COC es más rápida que la de la CUS, BE y EME (*Tabla 4*). Los alcaloides y metabolitos analizados son detectados/cuantificados hasta 1 h después de beber té de coca, excepto la trCIN que fue detectada solamente hasta 0,5 h (*Tabla 3*). Estos resultados muestran que beber solamente una taza de té de coca genera

Tabla 2. Concentración de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína después de mascar 5 g de hoja de coca.

		Tiempo	COC	CUS	BE	EME	CIN	HIG
		(horas)	(ng/mL)					
Tiempo de mascado de las hojas de coca	Blanco	-1,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Inicio de la colocación de las hojas de coca en la boca	-1,17	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	Final de la colocación de las hojas de coca en la boca	-1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	Se remueven las hojas de coca de la boca	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Muestras de FO		0,08	1768,5 ⁽¹⁾	3151,1 ⁽¹⁾	579,8 ⁽¹⁾	1080,1 ⁽¹⁾	445,1 ⁽¹⁾	Positivo
		0,5	974,1 ⁽¹⁾	3339,1 ⁽¹⁾	324,5 ⁽¹⁾	962,8 ⁽¹⁾	396,9 ⁽¹⁾	Positivo
		1	152,5	336,4	59,6	89,8	18,7	Positivo
		2	34,8	295,1	50,5	67,1	6,6	Positivo
		3,5	41,0	322,8	75,2	223,1	10,8	Positivo
		4,5	14,4	131,7	34,1	66,2	nd	Positivo
		6	16,0	115,4	22,8	26,4	nd	Positivo
		7,5	18,6	175,3	61,4	57,1	nd	Positivo
		9,5	11,4	125,6	44,5	33,8	nd	Positivo
		13,5	nd	52,5	7,6	<10	nd	Positivo
		23	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		26	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable, n/a: no aplica, ⁽¹⁾sobre el límite de cuantificación**Tabla 3.** Concentración de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína después de la ingesta de una taza de té de coca.

		Tiempo	COC	CUS	BE	EME	trCIN	TRO	HIG
		(horas)	(ng/mL)						
Muestra blanco		-1,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ingesta de té de coca		-0,10 a 0,00	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
		0,25	170,0	59,0	17,1	<10	9,1	nd	Positivo
Muestras de FO		0,50	67,8	43,7 ⁽¹⁾	10,0	<10	7,5	nd	Positivo
		1,00	19,1	39,7 ⁽¹⁾	15,3	<10	nd	nd	Positivo
		2,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable, n/a: no aplica, ⁽¹⁾bajo el límite de cuantificación

Tabla 4. Relación CUS/COC, relaciones metabolitos/cocaína; relaciones metabolito/cuscohigrina; relación BE/EME en fluido oral de masticador de hojas de coca y de bebedor de té de coca.

	Tiempo (horas)	CUS/COC	BE/COC	EME/COC	BE/CUS	EME/CUS	BE/EME
Masticador hoja de coca							
	Blanco	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	0,1	1,78	0,33	0,61	0,18	0,34	0,54
	0,5	3,43	0,39	0,99	0,10	0,29	0,34
	1,0	2,21	0,39	0,59	0,18	0,27	0,66
	2,0	8,48	1,83	1,93	0,17	0,23	0,75
	3,5	7,87	1,83	5,44	0,23	0,69	0,34
	4,5	9,14	1,43	4,60	0,26	0,50	0,52
	6,0	7,21	1,43	1,65	0,20	0,23	0,86
	7,5	9,42	3,90	3,07	0,35	0,33	1,08
	9,5	11,02	3,90	2,96	0,35	0,27	1,32
	13,5	n/a	n/a	n/a	0,14	<0,2	<0,7
	23,0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	26,0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Bebedor de té de coca							
	Blanco	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	0,25	0,35	0,10	<0,05	0,29	<0,2	>1,7
	0,50	>0,6	0,15	<0,2	0,23	0,25	>1,0
	1,00	>2,0	0,80	<0,5	0,39	<0,25	>1,8
	2,00	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a: no aplica.

Acta Toxicol. Argent. (2019) 27 (2): 72-80

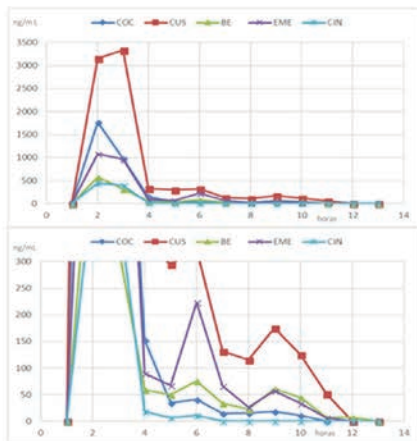


Figura 1. Perfil de concentración vs. tiempo de la COC, alcaloides de la hoja de coca y metabolitos en FO, después de mascar 5 g de hoja de coca por 1 h. A dos escalas de concentración.

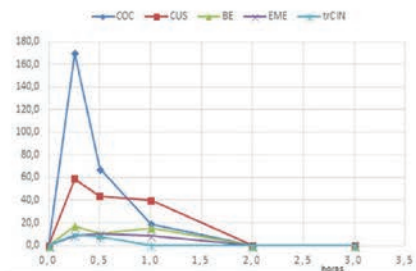


Figura 2. Perfil de concentración vs. tiempo de la COC, alcaloides de la hoja de coca y metabolitos en FO, después de beber una taza de té de coca comercial.

concentraciones en FO de COC y BE por encima de los niveles de *cut-off* recomendados por SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) (8 ng/mL) hasta al menos 1 h luego de la ingesta. (SAMHSA 2015). Reichardt 2014 reportó resultados similares en su tesis: Validation of Oral Fluid as a Matrix for Drug Detection.

Se halló una buena correlación entre los resultados positivos de la HIG y la CUS en todas las muestras de FO de ambos participantes (Tablas 2 y 3). Por último, la TRO uno de los alcaloides menos abundante de la hoja de coca (Moore 1995), no fue detectada en ninguna muestra de FO analizada.

Conclusión

Este estudio preliminar es uno de los primeros que aportan datos de la cinética de los alcaloides de la hoja de coca en FO luego del consumo de hojas de coca a través del mascado de hojas de coca o de la ingesta de té de coca. Los resultados obtenidos podrían estar indicando que el FO sería una muestra útil para ser empleada en los laboratorios de toxicología forense para auxiliar a la Justicia como en los accidentes producidos por manejar bajo la influencia de drogas, en los controles laborales de drogas de

abuso o en otras causas criminales. La CUS e HIG son positivas en el FO del participante que mascó hojas de coca aun cuando la COC y BE han disminuido su concentración por debajo de los valores *cut-off* propuestos por las guías internacionales con propósito de *screening* (15 a 20 ng/mL) y de confirmación (8 a 10 ng/mL) (SAMHSA 2015; EWDTS 2015; Logan y col. 2018). Similar consideración es encontrada en el participante que bebió una taza de té de coca, en el cual la CUS y la HIG siguen siendo positivas hasta 1 h después de la ingesta y de la detección de la COC y BE. Por lo tanto, CUS e HIG podrían ser en FO útiles marcadores para corroborar un consumo legal y reciente de hojas de coca (mascado o ingesta de té de coca), aunque no podemos excluir que conjuntamente hubiera un consumo ilegal de cocaína. Esto es al menos una prueba para corroborar en el ámbito judicial o laboral que la persona imputada dice la verdad al alegar un consumo lícito de hojas de coca. Finalmente, y como ya se mencionó en otras secciones de este trabajo este es un estudio preliminar porque está referido a un solo voluntario en cada caso. Además, el escenario puede ser diferente en consumidores de Argentina, Perú y Bolivia quienes pueden consumir hojas de coca en variadas frecuencias diarias, sema-

nales o mensuales, pudiendo llegar a mascarse 5 a 10 g en una única vez con y sin sustancias alcalinas o en varias sesiones diarias u otras alternativas de consumo. Algunos autores han mostrado que repetidas administraciones orales cambian la relación de concentración de la COC y de sus mayores metabolitos (BE y EME) (Coe y col. 2018), en consecuencia, se requiere seguir investigando sobre este tema.

Bibliografía citada

- Bosker W.M., Huestis M.A., Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse. *Clin Chem.* 2009; 55(11):1910-1931.
- Casale J.F., Klein R.F.X. Illicit production of cocaine. *Forensic Sci Rev.* 1993;5:95-107.
- Coe M.A., Jufer Phipps R.A., Cone E.J., Walsh, S.L. Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral Cocaine in Humans. *Journal of Analytical Toxicology.* 2018;42:285-292.
- Drager B. Review Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A.* 2002;978:1-35.
- Drummer O.H. Drug testing in oral fluid, *The Clinical Biochemist Reviews.* 2006;27(3):147-159
- European Workplace Drug Testing Society (EWDTS). European guidelines for workplace in oral fluid. 2015. Versión 02. [en línea]. Disponible en: <http://www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-oral-fluid-2015-05-29-v02.pdf>. (Consulta: 15 de enero de 2018).
- InfoLEG: Información Legislativa y Documental. Ministerio de Justicia y Derechos Humanos. Ley 23737. [en línea]. Disponible en: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=138>. (Consulta 15 de enero de 2018).
- Logan B.K., D'Orazio A.L., Mohr A.L., Limoges J.F., Miles A.K., Scarneo C.E., Kerrigan, Liddicoat L.J., Scott K.S., Huestis M.A. Recommendations for Toxicological Investigation of Drug-Impaired Driving and Motor Vehicle Fatalities—2017 Update. *Journal of Analytical Toxicology.* 2018;42:63-68.
- Moore J.F., Casale J.F., Fodor G., Jones A.B. Detection and Characterization of Cocaine and Related Tropane Alkaloids in Coca Leaf, Cocaine, and Biological Specimens. *Forensic Science Review.* 1995;7(2):77-101.
- Reichardt E.M. (2014). Validation of Oral Fluid as a Matrix for Drug Detection-Thesis Bournemouth University [en línea]. Disponible en http://eprints.bournemouth.ac.uk/21492/1/Reichardt%2CEva%20M_%20PhD_2014.pdf. (Consulta: 15 de julio de 2018).
- Rubio N.C., Bermejo-Barrera P., Bermejo A., Moreda-Piñeiro A. Development of a reliable method for assessing coca alkaloids in oral fluid by HPLC-MS/MS. *Journal of Analytical Toxicology.* 2019;43:196-202.
- Rubio N.C., Hastedt M., Gonzalez J., Pragst F. Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. *Int. J. Legal Med.* 2014b;129(1):69-84
- Rubio N.C., Marquez C., Confalonieri A., Castiglione J.L. La eliminación de la higrina y cuscohygrina en las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascaradores de hoja de coca de consumidores de cocaína. Poster, TIAFT, Perú. 2015.
- Rubio N.C., Strano-Rossi S., Tabernero M.J., Anzillotti L., Chiarotti M., Bermejo A.M. Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Sci. Int.* 2013;227(1-3):60-3.
- Rubio N.C., Strano-Rossi S., Tabernero M.J., González J.L., Anzillotti L., Chiarotti M., Bermejo A.M. Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 2014a;243:30-34
- Rubio N.C., Thurmann D., Krumbiegel F., Pragst F. Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast to cocaine abuse. *Drug Test and Anal.* 2017;9(2):323-326.
- Scheidweiler K.B., Kolbrich Spargo E.A., Kelly T.L., Cone E.J., Barnes A.J., and Huestis M.A. Pharmacokinetics of Cocaine and Metabolites in Human Oral Fluid and Correlation with Plasma Concentrations following Controlled Administration. *Ther Drug Monit.* 2010;32(5):628-637.

Acta Toxicol. Argent. (2019) 27 (2): 72-80

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs-oral fluid. Federal Register, 80 FR 28053- 2015 Version. Department of Health

and Human Services, [en línea]. Disponible en: <https://www.federalregister.gov/documents/2015/05/15/2015-11523/mandatory-guidelines-for-federal-workplace-drug-testing-programs>. (Consulta: 15 de enero de 2018).

Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea.(RESUMEN TIAFT-BOCA RATON- 2019)

(Rubio N.C; Bermejo-Barrera P; Bermejo A.M; Moreda-Piñeiro A.

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry

University of Santiago de Compostela, S. C. SPAIN

INTRODUCTION: Chewing coca leaves or drinking coca tea (coca use) is a legal activity in countries as Argentina, and it is therefore necessary a way for distinguishing the legal use of coca leaves from illicit cocaine abuse in driving under the influence of drugs and workplace drug testing. Cuscohygrine (CUS) and hygrine (HYG) have been previously considered as markers of coca use.

OBJECT: The aim of the current research has been to know the presence of CUS and HYG in oral fluid from coca users (coca leaves chewers and coca tea drinkers) and the relationship of these two alkaloids with cocaine (COC), benzoylecgonine (BE); ecgonine methyl ester (EME); cocaethylene (CE); trans-cinnamoylcocaine (trCIN), tropococaine (TRO).

METHOD: Oral fluid samples a coca chewer were collected by spitting after 5 and 30 min of use, and after 1.0, 2.0, 3.5, 4.5, 6.0, 7.5, 9.5, 13.5, 23 and 26 h. The second volunteer drunk a cup of coca tea, and oral fluid was collected after 5 and 30 min, and after 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 24 h. Oral fluid blanks were collected before coca leaves chewing or drinking coca tea (0 h). Oral fluid samples were analyzed in a LC-MS/MS under previously validated conditions.

RESULTS: The concentration (ng/mL) peak in the coca chewer volunteer was at 5 and 30 min: COC (1768.5-974.1); CUS (3151.1-3339.1); BE (579.8-324.5); EME (1080.1-962.8) and trCIN (445.1-396.9); the last quantifiable concentration was at 3.5 hrs. for trCIN (10.8); 9.5 hrs. for COC (11.4) and EME (33.8); 13.5 hrs. for CUS (52.5), BE (7.6) and HYG (Pos.). TRO and CE were negative in all samples.

The concentration (ng/mL) in the coca tea drinker volunteer was at 15 min and 1 h: COC (170- 19.1), CUS (59-39.7), BE (17-15.3), EME (8.6 -8.1), trCIN (9.1ng/ml- ND), HYG (Pos.). TRO and CE were negative.

CONCLUSION: Testing CUS and HYG in oral fluid is a promising tool in driving under the influence of drugs and workplace drug testing to distinguish among coca users (coca leaves chewers and coca tea drinkers). CUS and HYG are also quantified and detected at concentrations lower than the cut-off values of 20 ng/mL and 8 ng/mL suggested by COC and BE in oral fluid screening and confirmation tests (Logan B. JAT2017).

Coca alkaloids profile in oral fluid from people CHEWING COCA LEAVES AND DRINKING COCA TEA

Rubio N.C.¹; Moreda-Piñeiro A.²; Bermejo-Barrera P.²; Bermejo A.M.³

¹-LATOQUIL-Patagonia -Argentina

²-Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

³-Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" (INCIFOR), Department of Pathologic Anatomy and Forensic Sciences, Faculty of Medicine, Universidade de Santiago de Compostela, Rúa de San Francisco, s/n. 15782 Santiago de Compostela, Spain.

INTRODUCTION

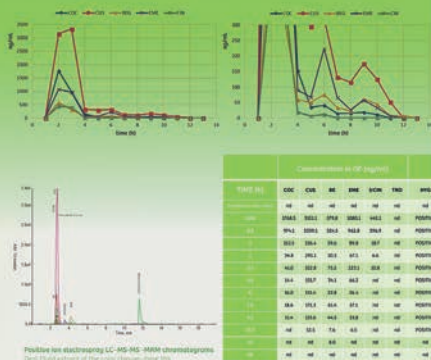
Coca leave chewing and coca leave consumption as coca tea are legit practices in countries like Argentina. The differentiation between people who use coca leaves and cocaine abusers is a great challenge in Argentina that needs an urgent solution in URUB, workplace drug testing and forensic cases. In previous works, two markers of coca leave chewing (hygrine, HYG, and cuscohygrine, CUS) have been proposed for screening/confirmation purposes in urine and hair.

SAMPLE/METHOD: oral fluid was collected by spitting and after centrifugation the supernatant was treated for protein removal by adding acclified acetonitrile and measurement by validated method by LC-MS/MS.

OBJECTIVE > The attention of this work was focused on confirming whether HYG and CUS are positive in oral fluid at the same recommended cut-off values for cocaine (COC) and benzoecgonine (BE) proposed by international guidelines: 15 to 20 ng/mL for screening, and 8 to 10 ng/mL for confirmation purposes. Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea was studied.

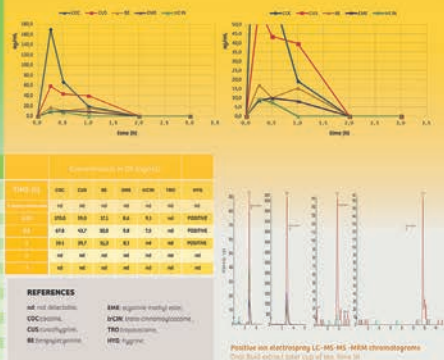
01

One volunteer who
chewed coca leaves,
5 grs/1 h. + alkaline substance.



02

One volunteer who
drunk a cup of coca tea



CONCLUSION

Testing CUS and HYG in oral fluid is a promising tool to certify when people chewing coca leaves or drink tea in drugs control in driving or workplace drugs testing.

CUS and HYG are also quantified at concentrations lower than the cut-off values of 20 ng/mL and 8 ng/mL suggested by COC and BE in oral fluid screening and confirmation tests (Logan Barry 2017).

6.7 GRUPO E ESTUDIOS REALIZADOS EN PLASMA.

El plasma/suero nos da una foto instantánea para conocer el estado de un individuo.

Se investigó en un voluntario que mascó hojas de coca (8g) el perfil en plasma de los niveles de cocaína, benzoilecgonina y cuscohigrina vs tiempo, empleando cromatografía gaseosa con detector de masa (CG-MS), la extracción se realizó con columnas de fase estacionaria (SPE). Además, se tomaron paralelamente muestras de orina para conocer las ventanas de eliminación de la benzoilecgonina, medida a través de un test de screening por inmunoensayo (COBAS INTEGRA 400) y de cocaína y cuscohigrina analizadas por CGMS.

Detalles analíticos son descritos en el *Capítulo 5, sección 5.3.4.*



6.7.1. Ventana de detección en plasma y orina de un mascador de hojas de coca de cocaína, benzoilecgonina y cuscohigrina.

Los resultados preliminares fueron presentados en formato poster en el congreso TIAFT-2019 de Birmingham.

El esquema de la toma de muestras de sangre (luego fueron extraídas para obtener el plasma) y las concentraciones de cocaína (COC) y benzoilecgonina (BEG) se muestran en la **Tabla 6-9** y el perfil concentración vs tiempo en la **Figura 6-5**.

Cocaine, benzoylecgonine and cuscohygrine profile in plasma from a volunteer who chews coca leaves. Preliminary study. TIAFT- Birmingham - septiembre 2019.



Time		Observation	COC	BEG
(h)			(ngmL ⁻¹)	(ng mL ⁻¹)
Time for chewing coca leaves (8 g = 36mg Cocaine)	-0.15	Plasma blank sample	nd	nd
	0	Time for placing coca leaves into the mouth	nd	nd
		Time for finishing coca leaves placement into the mouth.		
	0.25		nd	nd
	0.5		nd	nd
	0.75		nd	nd
	1.0		15.0 *	22.1
	1.25		45.4	199.8
	1.5		46.1	280.3
	2.25		60.7	296.4
	2.75		105.8	640.6
	3.25	Time for removing coca leaves from the mouth	51.5	811.4
	4.5		22.4	745.4
	5.5		14.8 *	650.9
	6.25		nd	585.2
	10		nd	482.2
	12		nd	388.8
	14		nd	337.1
24		nd	126.5	

nd: not detectable
COC: cocaine; BEG: benzoilecgonine
* Below calibration range.

Tabla 6-9: Esquema de toma de muestras de sangre en un mascarador de hojas de coca (8g) y su concentración en plasma de cocaína (COC) y benzoilecgonina (BEG).

PLASMA

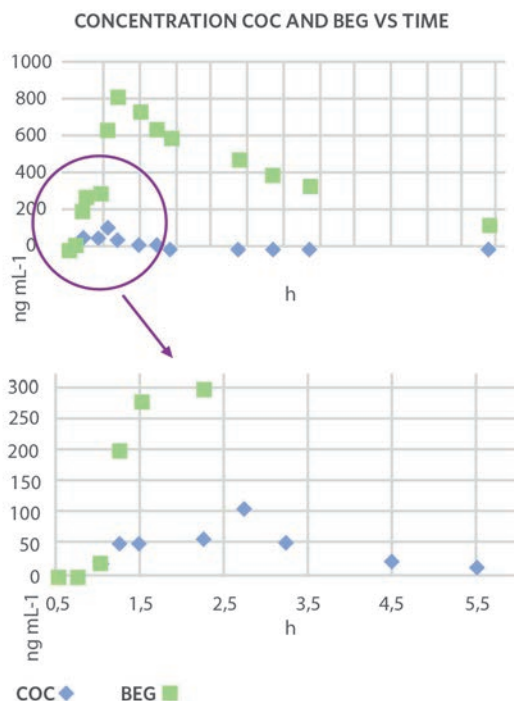


Figura 6-5: Concentración en plasma (ng mL⁻¹) de cocaína (COC) y benzoilecgonina (BEG) vs tiempo.

Las muestras de orina del voluntario que mascó hojas de coca se toman según el esquema mostrado en la **Tabla 6-10**, en la cual también se detallan los resultados obtenidos (datos no publicados).

Detection window of cocaine, benzoylecgonine, and cuscohygrine in plasma and urine of a chewer of coca leaves by GCMS and immunoassay COBAS 400- Preliminary results. (Trabajo para presentar a revisión)

	Time	Immunoassay	GCMS	
	(h)	Cut-off: 300 ng mL ⁻¹ BEG	COC*	CUS*
urine blank sample	-0.20	Negative	nd	nd
Time for placing coca leaves into the mouth	0	Negative	nd	nd
	0.50	Negative	nd	nd
	1.0	Positive	(+)	(+)
	4.0	Positive	(+)	(+)
	8.0	Positive	(+)	(+)
	12	Positive	nd	(+)
	16	Positive	nd	(+)
	24	Positive	nd	(+)
	30	Positive	nd	(+)
	36	Positive	nd	(+)
	40	Negative	nd	(+)

* Detection limit COC = 50 ng mL⁻¹; CUS = 200 ng mL⁻¹

Tabla 6-10 Esquema de toma de muestra de un mascarador de hojas de coca (8g) y los resultados obtenidos por inmunoensayo y cromatografía gaseosa con detector de masa (CGMS).

Conclusiones de las **Tablas 6-9** y **6-10** y **Figura 6-5** correspondientes a un voluntario que mascó 8 gr de hoja de coca correspondiente a 36 mg de cocaína (según análisis realizado por LCMSMS):

- Una ingesta de 36 mg de cocaína es considerada ser una dosis baja a mediana.
- El perfil de la concentración de cocaína en función del tiempo no muestra una pendiente pronunciada (**Figura 6-5**), alcanzando la concentración máxima a las 2,75 h (105.8 ng/mL), esto podría explicar los bajos efectos farmacológicos del mascarador de hojas de coca comparado con el consumidor de cocaína.
- La ventana de detección de la cocaína en plasma fue de 5,5 h mientras que su metabolito la benzoilecgonina se detectó durante más de 24h.
- Cuscohigrina no fue detectada en plasma, un punto a seguir investigando si fue debido a falta de sensibilidad en el método empleado o

bien a interferencias durante el proceso de extracción por SPE.

■ El screening de cocaína en orina, que detecta su metabolito benzoilecgonina (cut-off 300 ng/mL), **resultó positivo hasta 36 h aproximadamente**, la confirmación por CGMS detectó cocaína hasta las 8h y cuscohigrina fue detectable por más de 40h. No se midió la benzoilecgonina en orina porque como fue explicado en el *Capítulo 5, sección 5.3.1.2*, no es extraída con metilterbutil éter.

■ Estos primeros resultados muestran que la ventana de eliminación de la benzoilecgonina y la cuscohigrina es de más de 24 h. para un individuo que masca 8g de hoja de coca empleando bicarbonato como sustancia alcalina. Por otro lado, que la cuscohigrina tenga un tiempo de eliminación en orina similar a la benzoilecgonina resulta muy positivo para poder diferenciar un mascador de hojas de coca de un consumidor de cocaína, aún, cuando han pasado varias horas de finalizado el mascado de hojas de coca.

■ El desarrollo de un anticuerpo monoclonal específico para cuscohigrina (inmunoensayo) sería una forma rápida de diferenciar a un individuo que hace un uso legal de las hojas de coca de un consumidor de cocaína. Sería para el Sistema Judicial Argentino o en los controles laborales un camino rápido, con ahorro de tiempo, dinero y los contratiempos de detener a un individuo que alega un uso permitido de la cocaína.

Cocaine, benzoylecgonine and cuscohygrine profile in plasma from a volunteer who chewing coca leaves. Preliminar study. (RESUMEN TIAFT BIRMIN-GHAM 2019)

Rubio N.C.^{1,2}; Moreda-Piñeiro A.²; Álvarez-Freire I.³; Bermejo-Barrera P.²; Tabernero M.J.³; Bermejo A.M.³

¹ Toxicology Laboratory. Patagonia. Argentina.

² Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela Spain.

³ Instituto de Ciencias Forenses "Luís Concheiro" (INCIFOR Forensic Toxicology Service, Forensic Sciences Institute, Medicine School, University of Santiago de Compostela, C/ San Francisco s/n, 15782, Santiago de Compostela, Spain.

INTRODUCTION/AIM: oral use of cocaine (coca leaves chewing) is not the most common way of cocaine consumption; however, this practice is widespread in some South American countries such as Argentina, Bolivia, and Perú. Coca leaves are chewed (either alone or with alkaline substances as sodium bicarbonate or ashes) or they are brewed (coca tea) or used for preparing cookies, candies, liquors, etc. The aim of this preliminary study has been the assessment of concentration-time profiles in plasma for cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), and cuscohygrine (CUS) after coca leaves chewing (a volunteer who chewed 8 g of coca leaves). Literature regarding the metabolic profile and pharmacokinetics of oral cocaine is scarce, although CUS has been proposed as a marker of coca leaves chewing in urine, hair and oral fluid. The current study is the first one that tries to characterize the bioavailability of CUS in plasma and offers new data on the metabolic profile of COC and BE when consuming oral cocaine (coca leaves chewing).

METHOD: A healthy volunteer chewed 8 g of fresh coca leaves together with an alkaline substance (sodium bicarbonate) for approximately 3 h (corresponding to 36 mg of cocaine). An intravenous catheter was inserted into the antecubital vein for blood collection. A blood blank sample was taken at the beginning of the experiment (- 0.15 h). Coca leaves were then placed in the mouth at time 0 h, and blood samples were collected at 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.25, 2.75, 3.25, 4.0, 4.5, 5.5, 6.25, 8.0, 10, 12, 14, and 24 h. Blood (4 mL) was collected into 5 mL heparinized vacutainers containing 2% (w/v) sodium fluoride. Plasma was separated by centrifugation and immediately frozen at -20°C until analysis. Plasma samples were analyzed for COC, BE and CUS by a previously validated method implying SPE and GCMS (BSTFA with 1% TMCS as a derivatizing reagent). The MS was operated in the selected ion monitoring mode. Validated parameters were LOD (10 ng/ml for COC, BE and CUS), and LOQ (20 ng/ml for

COC, BE, and CUS).

RESULTS:

	Cmax	Detection window	Range	Median
	(ng/mL)	(h)	(ng/mL)	(ng/mL)
COC	105.8	1- 4.5	d- 105.8	46.1
BE	811.4	1- >24	22.4- 811.4	388.8
CUS	nd	---	---	

nd: not detectable; d: detectable

DISCUSSION: The concentration-time profile for COC shows that the concentration of COC is gradually increased and it reaches a peak at a time near 3.0 h. This profile seems different than those obtained when cocaine is administrated by intravenous, nasal or smoking via. COC has a detection window shorter than BE. BE is the major metabolite of the COC in plasma, and it is formed by hydrolysis in the mouth from COC due to the presence of alkaline substances during the chewing and also during extraction process. The detection time of BE is more than 24 h in plasma. CUS was not detected in any plasma samples (LOD is 10 ng/mL). CUS is probably less absorbed than COC from the oral cavity at alkaline pHs (CUS has different chemical properties such as pKb and octanol partition than COC).

CONCLUSION: This preliminary study involves only one volunteer and definitive conclusions are therefore limited. The pattern of the use of coca leaves is variable (several times a day, or per week, or per month). In addition, people can chew coca leaves with or without alkaline substances which modifies oral fluid pH and hence the alkaloids absorption. The concentration- time profile could be therefore different in people with a chronic use of coca leaves.

Probably, the gradual COC releasing in plasma does not allow reaching a high concentration in plasma and it would justify the non-occurrence of adverse effects of cocaine in people who chewing coca leaves. More research is needed for establishing a more precise concentration-time profile in plasma.

The assessment of CUS in plasma samples need a more sensitive method, thus, our GCMS method for CUS detection in plasma is unable to do the discrimination between the legal or illegal use of COC in countries as Argentina, Bolivia or Perú.

Cocaine, benzoylecgonine and cuscohygrine profile in plasma

From a volunteer who chews coca leaves
Preliminary study

Rubio N.C.^{1,2}; Moredo-Piñero A.2; Álvarez-Freire I. 3; Bermejo-Barrera P.2; Tabernero-Duque M.J. 3; Bermejo A.M.3

¹ Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina. ² Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela Spain. ³ Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" (INCIFOR) Forensic Toxicology Service, Forensic Sciences Institute, Medicine School, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

INTRODUCTION

Oral use of cocaine (coca leaves chewing) is not the most common way of cocaine consumption; however, this practice is widespread in some South American countries such as Argentina, Bolivia, and Perú. Coca leaves are chewed (either alone or with alkaline substances as sodium bicarbonate or ashes) or they are brewed (coca tea) or used for preparing cookies, candies, liquors, etc.

AIM: The aim of this preliminary study was the assessment of concentration-time profiles in plasma for cocaine (COC), benzoylecgonine (BE), and cuscohygrine (CUS) after coca leaves chewing (a volunteer who chewed 8 g of coca leaves, 36 mg of cocaine).

CUS has been proposed as a marker of coca leaves chewing in urine, hair and oral fluid.

The current study is the first one that tries to characterize the bioavailability of CUS in plasma and offers new data on the metabolic profile of COC and BE when consuming oral cocaine (coca leaves chewing).

A) SPECIMEN COLLECTION



A healthy volunteer chewed 8 g of fresh coca leaves together with an alkaline substance (sodium bicarbonate) for approximately 3 h (corresponding to 36 mg of cocaine). An intravenous catheter was inserted into the antecubital vein for blood collection. Blood (4 mL) was collected into 5 mL heparinized vacutainers containing 2% (w/v) sodium fluoride. Plasma was separated by centrifugation and immediately frozen at -20°C until analysis.

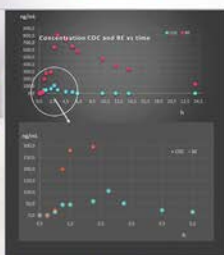
METHOD

Plasma samples were analyzed for COC, BE and CUS by a previously validated method implying SPE (Strata™-X 33 µm Polymeric Sorbent) and GC/MS (BSTFA with 1% TMCS as a derivatizing reagent). The MS was operated in the selected ion monitoring mode. Validated parameters were LOD (10 ng/mL for COC, BE and CUS), and LOQ (20 ng/mL for COC, BE, and CUS).

B) SPECIMEN ANALYSIS

PLASMA COLLECTION SCHEMATIC			
Time (h)	Plasma	Urine	Saliva
0	✓	✓	✓
1	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓
3	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓
5	✓	✓	✓
6	✓	✓	✓
7	✓	✓	✓
8	✓	✓	✓
9	✓	✓	✓
10	✓	✓	✓
11	✓	✓	✓
12	✓	✓	✓
13	✓	✓	✓
14	✓	✓	✓
15	✓	✓	✓
16	✓	✓	✓
17	✓	✓	✓
18	✓	✓	✓
19	✓	✓	✓
20	✓	✓	✓
21	✓	✓	✓
22	✓	✓	✓
23	✓	✓	✓
24	✓	✓	✓

Results



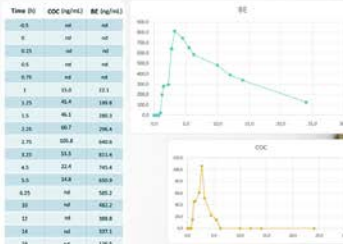
	Omax (ng/mL)	Detection window (h)	Range (ng/mL)	Median (ng/mL)
COC	105.8 (2,75h)	1-4.5	> LOD-105.8	46.1
BE	811.4 (3,25h)	1-24	22.4-811.4	388.8
CUS	nd			

nd: not detectable

REFERENCES:
1. N. C. Rubio, S. Strano-Rossi, M. J. Tabernero, A. M. Bermejo, L. González, M. Chiquero, A. M. Bermejo. Application of cocaine and benzoylecgonine as possible markers in saliva and urine in chronic cocaine users. *Forensic Sci Int*. 2014;243:104-110. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.02.024. Epub 2014 Mar 6.

2. N. C. Rubio, M. González, L. González, I. Pérez. Possibilities for discrimination between chronic and occasional cocaine users by cocaine and benzoylecgonine in saliva and urine. *Forensic Sci Int*. 2014;243:104-110. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.02.024. Epub 2014 Mar 6.

3. Martínez, C. Concha-Rodríguez, J. López-Pérez, E. Gómez, J. Gómez, and J. Gómez. Bioavailability and Pharmacokinetics of Cocaine in Humans. *Journal of Analytical Toxicology*. 2014;38:205-210. doi: 10.1093/jat/kkt007.



Conclusions

11 This preliminary study involves only one volunteer and definitive conclusions are therefore limited.

21 The pattern of the use of coca leaves is variable (several times a day, or per week, or per month). In addition, people can chew coca leaves with or without alkaline substances which modifies oral fluid pH and hence the alkaloids absorption. The concentration-time profile could be therefore different in people with a chronic use of coca leaves.

31 Probably, the gradual COC releasing in plasma does not allow to reach a high concentration in plasma and it could justify the non-occurrence of adverse effects of cocaine in people who chewing coca leaves. More research is needed for establishing a more precise concentration-time profile in plasma.

41 The assessment of CUS in plasma samples need a more sensitive method. Thus, our GC/MS method for CUS detection in plasma is unable to do the discrimination between the legal or illegal use of COC in countries as Argentina, Bolivia or Peru.

USC
UNIVERSITY OF SANTIAGO DE COMPOSTELA

(TRABAJO PARA SER ENVIADO A REVISION)

Detection window of cocaine, benzoylecgonine, and cuscohygrine in plasma and urine of a chewer of coca leaves by GCMS and immunoassay COBAS 400-Preliminary results.

Rubio N.C.^{1,2,3}; Moreda-Piñeiro A.²; Álvarez-Freire I.³; Cabarcos P.³; Bermejo-Barrera P.²; Tabernero-Duque M.J.³; Bermejo A.M.³

¹Toxicology Laboratory. Patagonia. Argentina.

²Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela Spain.

³Instituto de Ciencias Forenses “Luís Concheiro” (INCIFOR Forensic Toxicology Service, Forensic Sciences Institute, Medicine School, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain.

1. Introduction

Chewing coca leaves and drinking coca tea are legal practices in some South American countries such as Peru, Bolivia and Argentina. Chewing coca leaves is a highly controversial habit since scientific community has not agreed on whether it is potentially dangerous or not. Argentina has a Federal Law 23737 mod. 26052, art.15 [1] that allows chewing coca leaves or drinking coca tea. In recent years, the increase in workplace drugs testing and traffic controls has led to the need for differentiating the legal use of cocaine (chewing coca leaves and drinking coca tea) and the illegal use (snorted, intravenous or smoked cocaine). Currently, there are already claims at the Judicial level in Argentina for positive results of cocaine in urine due to a legally accepted practice.

Recently, two constituent alkaloids of coca leaf: hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) and secondarily cinnamoylcocaine (CIN) have been proposed as markers of consumption of coca leaves in urine, hair and oral fluid [2-4]. Legal investigation in the Court requires to know the time during which a urine analysis is positive to cocaine in coca leaf chewers. The screening of cocaine in workplace drug testing and traffic control for urine analysis uses immunoassays based on antibodies specific to benzoylecgonine (BEG) recognition, and a positive result must be further confirmed by mass spectrometric techniques such as gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). There are not immunoassays based on specific antibodies for HYG, CUS, and CIN, and these targets must be confirmed by GC-MS or LC-MS/MS when immunoassay results are positive for cocaine (benzoylecgonine).

There is wide literature establishing the profile of plasma cocaine (COC) and its metabolites such as BEG, methylecgonine (MEG), norcocaine (NC) and cocaethylene (CE) in controlled trials with volunteers who consume certain doses of COC by several routes, oral consumption included [5-8]. However, there is scarce literature regarding COC and main metabolites (BEG and MEG) in chewers of coca leaves [9-11].

2. Objectives

The aims of this work have been:

1) The assessment of the profile of COC, BEG and CUS in plasma from a volunteer who chewed coca leave, showing the ability of the proposed method for detecting CUS. 2) The establishment of the detection window for COC, BEG and CUS in urine after chewing coca leaves by immunoassay and GC-MS.

3. Material and Methods

3.1 Standards, chemicals, and materials

Standard solutions were prepared from COC and BEG stock standards (1000 µg/mL dissolved in acetonitrile) supplied by Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Deuterated analogue stock standard solutions were prepared from cocaine-d3 (COC-d3) and benzoylecgonine-d3 (BEG-d3) in acetonitrile (100 µg mL⁻¹), also from Cerilliant. CUS (10 mg) was from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada).

Acetonitrile, methanol, and 2-propanol (LC-MS grade) were from Riedel-de Haën (Seelze, Germany); ammonium hydroxide, acetic acid, tert-butyl methyl ether (TBME), and formic acid (98%) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain); N, O-bis (Trimethylsilyl)trifluoroacetamide with Trimethylchlorosilane (BSTFA and TMCS) was from Merck (Darmstadt, Germany); and ammonium formate (99%) was from Fluka (Steinheim, Germany). Ultrapure water 18 MΩ cm of resistivity was obtained from a water purification device from Millipore Co. (Bedford, MA, USA). Cellulose acetate syringe filters (0.20 µm) were from Labbox Labware S.L. (Barcelona, Spain). Strata™ -X 33 (SPE) was obtained from Phenomenex (Torrance, CA, USA).

3.2 Instrumentation

Determinations were carried out with three instruments:

3.2.1. GC-MS equipment

An Agilent 6890A gas chromatograph (Santa Clara, CA, USA) equipped with an Agilent 5973 N mass spectrometer, and an Agilent HP-5MS capillary column 30 m \times 250 μ m i.d. internally coated with 5%-(phenyl) methylpolisiloxane (0.35 μ m thick film) were used for GC-MS analysis. The injector port of the gas chromatograph was maintained at 250 °C and operated in splitless mode for 2 min, and then purged for 2 min. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. Oven temperature started at 90 °C for 1 min, then temperature is increased at 35 °C/min ratio up to 200 °C, and then again at 15 °C/min up to 275 °C. Finally, oven temperature is maintained constant at 275 °C for 10 min. The injection volume was 2 μ L. The mass spectrometer was kept at 320 °C, the ion source at 230 °C, and the quadrupole at 150 °C. The mass analyser was operated by electron impact ionization (EI, 70 eV) and SIM acquisition mode (selected ion-monitoring). The monitored ions were COC: (182), 303, 198; COC-D3: (185), 306, 201; BEG: (82), 240; BEG-D3: 85, 243; CUS (84), 140, 209 (quantitation ions are highlighted in brackets and bold, other ions were used as qualifier ions). Targets identification by using the retention time was considered positive when retention times varied \pm 2% regarding the reference sample. Each diagnostic ion should form a chromatographic peak with a height that is at least three times the background (signal-to-noise-ratio \geq 3:1). Full SCAN acquisition mode was used for urine samples analysis.

3.2.2 LC-MS/MS equipment

A 3200 Q TRAP LC-MS/MS system (ABSciex, Concord, Canada), equipped with a Flexar FX-15 UHPLC binary chromatographic pump (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), and a Flexar UHPLC autosampler (Perkin Elmer) were used for LC-MS/MS measurements. Analyst 1.6 software (ABSciex) was used for system control and data acquisition; whereas, MultiQuant 2.1 software (ABSciex) was used for data processing. Separations were performed with an Infinity LabPoroshell 120 Hilic (2.7 μ m, 2.10 \times 100 mm) from Agilent. The column was temperature-controlled with a GECKO 2000 column heater from Amchro GmbH (Hattersheim, Germany). Chromatographic separation (20 min) was performed at 40 °C under gradient elution using 20 mM ammonium formate in ultrapure water (pH 4.2) as a mobile phase A, and 4:1 acetonitrile/methanol as a mobile phase B. At least two precursor ion \rightarrow product ion transitions were monitored for each analyte (COC and COC-d3) for guaranteeing the specificity (the presence of an analyte was confirmed when all qualifier MRM transitions were identified in each chromatographic run). Optimized ion source parameters (positive

ionization) were set at 400 °C for temperature, 5000 V for voltage, 20 for curtain gas, HIGH for collision gas, 20 for ion for source gas 1, and 15 for ion for source gas 2. Table 1 shows MS/MS data and retention times.

3.2.3. Roche COBAS INTEGRA 400 plus

An automated immunoassay analyzer COBAS INTEGRA 400 was used for screening cocaine in urine samples. Cocaine immunoassays were designed to detect benzoylecgonine at concentrations equal or higher than 300 ng mL⁻¹.

3.3 Volunteers

The volunteer was an adult female subject, in good health, who did not report having a history of drug use, suffering from illnesses or consuming medication. The study was carried out in a health centre with the volunteer monitored throughout the process. Signed informed consent was given before participation in the study.

3.3.1 Collection of plasma samples and extraction

Before starting the study and in order to have peripheral venous access available throughout the study, an intravenous catheter was placed in the volunteer's left forearm with a three-way stopcock and the first blood sample considered a blank sample was collected (t: - 0.15 h). Then the participant introduced 8 g of coca leaves in the mouth between cheek and jaw (t: 0 h) for approximately 15 minutes forming the "acullico" (coca leaf ball that is chewed to extract its stimulating substances). Chewing was performed for 3 h and sodium bicarbonate (alkaline substance) was added to the "acullico" now and then. Blood was sampled at 0 h (introduction of coca leaves in the mouth), and then at 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5, 2.25, 2.75, 3.25, 4.0, 4.5, 5.5, 6.25, 10, 12, 14 and 24 h (Table 2). Whole blood (4 mL) was collected in heparinized Vacutainer® tubes with 2% (w/v) sodium fluoride. Plasma was removed by centrifugation and immediately frozen at -20 °C until analysis.

3.3.2 Collection of urine samples.

The first urine sample considered as a blank sample was collected at t: -0.20 h; then, urine samples were taken at 0 h (beginning of the introduction of the coca leaves in the mouth), 0.5, 1, 4, 8, 12, 16, 24, 30, 36, and 40 h. (Table 3). The samples were kept at -20 °C in plastic tubes, adding 200 µL of 1 N HCl (pH close to 5) and 1%(w/v) sodium fluoride.

3.4. Cocaine concentration of the coca leaves used in the study.

Coca leaves (1 g) were cut into small fragments and two aliquots (50 mg each one) were weighed and subjected to extraction with 10 mL of 25:25:50 methanol/

acetonitrile/2mM ammonium formate under mechanical stirring at 40 °C for 24 h. Extracts were then 1 to 100 diluted (100 µL + 100 µL COC-D3 (1 µg mL⁻¹) + 9.8 mL of 5:95 20 mM ammonium formate/acetonitrile) before 0.22 µm filtration and LC-MS/MS analysis (injection volume of 10 µL) under optimized conditions [3].

Determinations were performed using a COC calibration curve between 10 to 800 ng mL⁻¹ prepared in duplicate and using COC-d3 as a deuterated internal standard.

3.5. Analysis of plasma samples

Plasma sample, calibrators, and controls were analyzed by a validated CG-MS method used for the routine determination of COC and BEG in plasma, which has been update and validated for CUS determination in this study. Samples were subjected to a solid phase extraction procedure (SPE) using StrataTM-X 33 µm Polymeric Sorbent columns consisting of reverse stationary phases chemically modified with styrene divinylbenzene. The columns were first conditioned by sequentially passing 2 mL of methanol and 2 mL of water before sample loading (1 mL of plasma + 25 µL of COC-d3 and BEG-d3 (2 µg/mL) + 1 mL of borate buffer pH 9.2). The column was then washed with 2 mL of 5% methanol in water, followed by 2 mL of 20:80 2 % (w/v) ammonium hydroxide/water. The column was then dried in vacuo for 20 min and finally the analytes were eluted from the column with 2 mL of 2 % (v/v) acetic acid in methanol. The eluate was evaporated to dryness under nitrogen stream, and the extract was derivatized with 40 µL of 99:1 BSTFA-TMCS. The vials were sealed and left at 100 °C for 20 min, and 2 µL were used for GC-MS analysis.

Calibration curves were obtained in plasma blank samples (drug free) at concentrations within the 20-400 ng mL⁻¹ range for COC, BEG and CUS, and using COC-d3 and BEG-d3 as internal standards (R² were higher than 0.99 for all cases). The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were established when the signal/noise ratio was higher than 3 and 10, respectively, and values of LOD of 10 ng mL⁻¹ for the three analytes, and LOQ of 20 ng mL⁻¹ for the three targets were obtained. Control samples containing all analytes at concentrations of 50 and 200 ng mL⁻¹ were processed in duplicate and run with each sample set, and repeatability of measurements were found to be lower than 20%. CUS recovery was 75% and no interfering compounds were found when ten blank plasma samples were analysed.

3.6 Analysis of urine samples

3.6.1. Sample preparation for immunoassay

Immunoassay qualitative analysis was performed under manufacturer's recom-

mendations as follows: 200 μL of urine were placed in the cuvette and it was directly introduced in the equipment. After a few minutes the COBAS provides qualitative information which implies a positive result when the concentration is higher than 300 ng mL^{-1} .

3.6.2. Sample preparation for GCMS

Urine samples were pre-treated by a liquid-liquid extraction (LLE) procedure reported elsewhere [12]. The LLE procedure implies 3 mL of urine adjusted at pH 9 by using a 1.7 g of sodium carbonate/sodium hydrogen carbonate (1:8) buffer and 3 mL of tert-butyl methyl ether as an organic extractant. After extraction, the organic layer was separated and evaporated under a gentle nitrogen stream, and the extract was reconstituted in 40 μL of methanol for GC-MS analysis (injection volume of 2 μL). The method has been validated in previous work, showing a LOD of 50 ng mL^{-1} for COC and 200 ng/mL for CUS [12].

4. RESULTS

Cocaine was detected in plasma after 1 h from the beginning of coca leaves chewing (Table 2) at a concentration of 15 ng mL^{-1} (lower than the LOQ). The peak plasma concentration occurred at 2.75 h with a concentration of 105.8 ng mL^{-1} and the last concentration was found to be 14.8 ng mL^{-1} (lower than the LOQ) after 5.5 h. At the same time as COC, BEG was detected in plasma at a concentration of 22.1 ng mL^{-1} and remained positive until the last sample (after 24 h) with a value of 126.5 ng mL^{-1} . The peak plasma concentration for BEG occurred at 3.25 h with a concentration of 811.4 ng mL^{-1} . CUS was not detected in any of the analyzed plasma samples.

Results from urine samples analysis are shown in Table 3. The urine samples were monitored by immunoassay and GC-MS between -0.20 h to 40 h. The immunoassay COBAS 400 to benzoylecgonine (cut-off = 300 ng mL^{-1}) was positive in urine samples collected between 1 h to 36 h after the beginning of coca leaves chewing; whereas, cocaine and cuscohygrine were detected in urine with GCMS until 8h and 40h respectively, after the beginning of the experiment. The LLE method was not able to extract BEG [12] and results for this metabolite were not available.

Regarding coca leaves, the cocaine amount was 36 mg in the 8 gr of coca leaves.

5. DISCUSSION

Literature regarding plasma concentration of COC and metabolites, and other alkaloids from people who chews coca leaves is scarce. The few data mentioned in the literature are detailed below, some of them are from people who chewed coca

leaves and from volunteers who consume cocaine in capsules via oral ingestion.

Holmstedt et al. [9] have reported data from six volunteers whose consumed whole coca leaves and powdered coca leaves (plus an alkaline substance) with COC doses within the 15-50 mg range. The cocaine peak plasma levels were observed at 150 ng mL⁻¹ for 4.4 g of leaves, and 140 ng mL⁻¹ for 20 g powdered leaves. The peak plasma concentration occurred between 0.4 and 1.2 h for volunteers using powdered leaves and near 2 h for volunteers whose consumed whole coca leaves.

Paly et al. [10] carried out a study with thirty-eight men from the Andean zone of Peru with the habit of chewing coca leaves. Plasma COC concentrations after chewing 10 g of coca leaves reached a range of 50 to 90 ng mL⁻¹, levels that were higher (from 150 to 450 ng mL⁻¹) when chewing 15 g of coca leaves. The ingestion of the equivalent 25-150 mg of cocaine led to COC levels between 75 and 300 ng mL⁻¹, values that are similar than those found in people who consume orally or intranasally moderate doses of cocaine crystals. The study also included a case of a participant who chewed 50 g of coca leaves, experiment which revealed a maximum plasma COC concentration of 850 ng mL⁻¹.

The assessment of cocaine metabolites such as BEG, were not considered in the assays developed by Holmstedt et al. [9] and Paly et al. [10].

Rerat et al. [11] determined the amount of plasma COC and BEG from twenty-five male volunteers (Aymara Indians from the Bolivian Andes). A group of participants chewed coca leaves (amounts from 3 to 77 g), and plasma was collected after 45 min, and a second group did no chew coca leaves and the plasma was sampled after 20 min (respect to the beginning time of the group who chewed coca leaves). Plasma COC concentrations before the experiment were between 28 and 289 ng mL⁻¹ (average COC of 98±75 ng mL⁻¹ and average BEG concentrations of 219±197 ng mL⁻¹). After the experiment, COC levels ranged from 30 to 211 ng mL⁻¹ (average of 86±54 ng mL⁻¹), and an average BEG concentration of 414±234 ng mL⁻¹. The authors did not find correlation between plasma COC and BEG and the amount of coca leaves chewed.

Previous cocaine pharmacokinetic studies have shown that COC is well absorbed by the gastrointestinal tract when administered orally in capsules, being detectable in plasma after 30 min, and reaching a concentration peak near 60 min (209 ng mL⁻¹). The total dose ranged from 115 to 246 mg [13,14].

Coe et al. [8] reported maximum concentrations (C_{max}) between 45.1 to 201 ng mL⁻¹ with maximum times (T_{max}) between 0.8 and 2 h when 100 mg of cocaine is

oral (capsules) administered (experiment performed with fourteen volunteers). The graph of oral cocaine administration concentration vs. time shows a shift to the right and down respect to the profile obtained when intravenous administration is used [8]. Absorption kinetics of COC and the increase rate of plasma COC concentration were found to be dependent on the administration route (intranasal, intravenous, oral, by smoking), which is related to the quality and intensity of the psychotropic effects of cocaine. The onset of the effect for oral consumption begins at 30 min, while if the consumption is intravenous, smoked or snorted, this onset is almost instantaneous.

Cocaine reaches the blood after passing through the oral mucosa or after being absorbed in the gastrointestinal tract. The use of alkaline substances during chewing would improve COC absorption, but COC could be hydrolysed to BEG under alkaline conditions and COC bioavailability can therefore decrease. Rivier et al. [15] reported that cocaine hydrolysis did not exceed 17% after 1 h at 37 °C in alkaline medium, but the magnitude of these events has not been studied.

The concentration profile after experiments with a single volunteer and after a single coca leaves chewing session is not a characteristic pattern because a single chewing is not a real situation. Therefore, few conclusions can be reached in this preliminary study. The practice of chewing coca leaves is a custom in northern Argentina, and it consists of a daily use of coca leaves with a frequency of one to several times a day, seven days a week.

In our experiment, the C_{max} and the detection window were 105.8 ng mL⁻¹ and 5.5 h for COC, and 811.4 ng mL⁻¹ and >24 h for BEG, values that agree to the published literature [9-11]. Some authors have reported plasma COC detection time around 30 min [5,6,8], while we have a larger detection time (close to 1 h). The difference must be explained taking into account the higher limit of detection of the proposed analytical method (1 ng mL⁻¹ vs 10 ng mL⁻¹). The T_{max} close to 3 h could be due to the fact that chewing coca leaves implies a sustained alkaloids absorption over time, quite different to the intermittent street administration (Graphic 1). The time required for reaching the plasma COC concentration peak value in coca leaves chewers is slower than those reported when cocaine is smoked or injected (observed COC concentration changes are more abrupt). Van Dyke et al. [12] suggested that quality and intensity of cocaine's psychotropic effects may be related to the rate of change of COC plasma concentration rather than to the absolute COC level.

In our study, the volunteer chewed 8 g of coca leaves, equivalent to 36 mg of

cocaine. This means a low to medium doses of cocaine.

Plasma CUS was not detected in our study, the applied method needs to be improved. COC is more lipophilic than CUS (Log octanol/water values of 2.6 and 0.722 for COC and CUS, respectively) [16], and under alkaline conditions (coca leaves chewing) COC is uncharged and can easily cross the oral mucosa membrane and can diffuse through it according to the concentration gradient; whereas, CUS will remain more in the oral fluid (aqueous medium) [3].

Urine from coca leaves chewers showed positive immunoassay results for COC at least for 36 h, although inter-individual differences, kidney function, amount of coca leaves, chewing frequency, etc. can modify this value. Cocaine drug abuse screening in urine has a focus on the detection of BEG because the BEG biological half-life is longer than COC (5-8 h vs 1 h). The presence of COC and CUS was confirmed in urine samples by GC-MS with a detection window of 8 and 40 h, respectively. Previous work [17,18] have reported that CUS has a similar time of elimination in urine than BEG (more than 72 h, results obtained by LC-MS/MS from a volunteer who chewed 5 g of coca leaves).

6. CONCLUSION

Chewing coca leaves remains a controversial issue from the point of view of health, regional economy and the political situation of each country. Argentina has allowed the consumption of coca leaves (chewing or coca tea) and the toxicology laboratory must therefore give a solution to make the differentiation to legal vs illegal uses.

Our volunteer chewed coca leaves equivalent to 36 mg of cocaine which means a medium to low dose of COC. The COC profile in plasma (Graphic 1) has not shown an abrupt slope to reach the T_{max}. (2.7 h) as reported for experiments involving intravenous administration and smoking. This would explain the lower pharmacological effects in coca leaves chewers than those observed in other cocaine abusers. The detection window of COC in plasma was short (5.5 h) but BEG can be detected in plasma for more than 1 day.

Cuscohygrine was not detected in the analysed plasma samples. It has not been possible to find an explanation for this since the used method showed a relatively good analytical recovery (71%) and the LOD was quite low (10 ng mL⁻¹). Because of the detection window of CUS and BEG in urine was found to be similar, CUS behaviour is expected to be similar to other cocaine metabolites although this marker was not

detected in plasma under the experimental analytical conditions used in the current research. In addition, CUS is an alkaloid in a high percentage in the coca leaves. Therefore, conclusions regarding plasma CUS levels after controlled coca leaves chewing cannot be fully addressed, and there are several still unknown issues that must be studied such as CUS stability in plasma and the existence of interferences. In addition, the expected low plasma CUS concentrations require analytical method showing very low LODs.

The detection window for COC screening in urine (close to 36 h) is important regarding workplace drug testing or traffic control, because COC screening can be positive in urine test even 36 h after stopping coca leaves chewing. Our study shows that CUS has a similar detection window in urine than BEG which means that a positive screening result for COC could be also positive for CUS.

This information is relevant regarding the importance of developing a highly specific monoclonal antibody directed toward CUS (immunoassay). Specific CUS screening in urine would allow the differentiation between legal use of coca leaves and illegal use of cocaine, which would help the Argentine Judicial System and workplace drug testing (saving time and cost). In addition, these new tests/analytical methods could provide a quick solution to many Court cases that cannot be answered/solved because of lack of scientific evidences.

Acknowledgments: This work was supported by the Xunta de Galicia (Grupo de Referencia Competitiva, grant number ED431C2018/19; and Program for Development of a Strategic Grouping in Materials – AEMAT, grant number ED431E2018/08). The authors also thank the Medical Service of University of Santiago de Compostela.

Compliance with ethical standards: The authors declare therefore that all volunteers have signed an informed consent for allowing the use of the provided blood samples and urine samples in this study.

Declaration of competing interest: None

References

[1] Argentine Federal Law 26052 Published in the Official Bulletin: 2005 August. Art. 15.

[2] N.C. Rubio, S. Strano-Rossi, M.J. Tabernero, J.L Gonzalez, L. Anzillotti, M. Chiarotti, A.M. Bermejo, Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. *Forensic Sci Int.* 243 (2014) 30-4. doi: 10.1016/j.forsciint.2014.02.024. Epub 2014 Mar 6.

[3] N.C Rubio, P. Bermejo-Barrera, A. Bermejo, A. Moreda-Piñeiro, Development of a reliable method for assessing coca alkaloids in oral fluid by HPLC-MS/MS. *Journal of Analytical Toxicology* 43(3) · November 2018. DOI: 10.1093/jat/bky076.

[4] N.C. Rubio, M. Hastedt, J. Gonzalez, F. Pragst. Discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis. *International Journal of Legal Medicine*-20 august 2014-DOI 10.1007/s00414-014-1061-

[5] R. A. Jufer, A. Wstadik, S. L. Walsh, B. S. Levine, E. J. Cone. Elimination of Cocaine and Metabolites in Plasma, Saliva, and Urine Following Repeated Oral Administration to Human Volunteers. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 24, October 2000.

[6] R. A. Jufer, S. Walsh, E. J. Cone. Cocaine and Metabolite Concentrations in Plasma During Repeated Oral Administration: Development of a Human Laboratory Model of Chronic Cocaine Use. *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 22, October 1998.

[7] K.B. Scheidweiler, E.A. Kolbrich Spargo, T.L. Kelly, E.J. Cone, A.J. Barnes, M.A. Huestis. Pharmacokinetics of Cocaine and Metabolites in Human Oral Fluid and Correlation with Plasma Concentrations following Controlled Administration. *Ther Drug Monit.* October 2010; 32(5): 628-637.

[8] M.A. Coe, R.A Jufer, E.J. Cone, S.L. Walsh. Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral Cocaine in Humans. *Journal of Analytical Toxicology*. 2018; 42:285-292.

[9] B. Holmstedt, J.E. Lindgren, L. Rivier, L. T. Plowman. Cocaine in blood of coca chewers. *Journal of Ethnopharmacology*, 1 (1979) 69-78.

[10] D. Paly, C. Van Dyke, P. Jatlow, F. Cabieses, R. Byck. Cocaine plasma concentrations in coca chewers. *Clin Pharmacol Ther* 25:240, 1979. (abstract)

[11] C. Rerat, M. Sauvain, P.P. Rop, E. Ruiz, M. Bresson, A. Viala. Liquid chromatographic analysis of cocaine and benzoylecgonine in plasma of traditional coca chewers from Bolivia during exercise. *Journal of Ethnopharmacology* 56 (1997) 173-178.

[12] N.C. Rubio, A. Moreda-Piñeiro, I. Álvarez-Freire, P. Bermejo-Barrera, M.J.

Tabernero-Duque, A.M. Bermejo. The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years. *Microchemical Journal* 151 (2019) 104215.

[13] C. Van Dyke, P. Jatlow, J. Ungerer, P.G. Barash, R. Byck. (1978) Oral cocaine: plasma concentrations and central effects. *Science*, 200, 211–213.

[14] P. Wilkinson, C. Van Dyke, P. Jatlow, P. Barash, R. Byck. (1980) Intranasal and oral cocaine kinetics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 27, 386–394.

[15] L. Rivier. Analysis of alkaloids in leaves of cultivates *Erythroxylum* and characterization of alkaline substances use during coca chewing. *Journal of Ethnopharmacology*, 3 (1981) 313 -335.

[16] B. Drager. Review Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A*. 2002; 978, 1-35

[17] E. Zytowski. Detection of various coca alkaloids in coca leaves and human specimen to proof the consumption of natural coca products via LC-MS/MS. Charité Berlin Institute of Forensic Medicine Department of Forensic Toxicology. Research thesis. 02.03. 2018.

[18] F. Krumbiegel, E. Zytowski, S. Hartwig, N.C. Rubio, F. Pragst. .Detection of coca alkaloids in coca leaves and urine samples to proof the consumption of natural coca products. Poster. Symposium der GTFCh, 11- 13. April 2019 in Mosbach (Baden)-Germany.

AVANCES EN LA DIFERENCIACIÓN DEL CONSUMO TRADICIONAL DE LA HOJA DE COCA DEL CONSUMO ILÍCITO DE COCAÍNA

Palabras clave: Higrina y cuscohigrina, mascaradores de hoja de coca, marcadores cocaína.
Key words: Higrine and cuscohigrine, coca chewing, cocaine markers, cocaine abuse.

En la Argentina la práctica de “mascar” hojas de coca o “coquear” no está prohibida y es ampliamente difundida no sólo en la población indígena de nuestro país sino que su uso ha alcanzado todos los niveles sociales. La diferenciación del uso ancestral de la hoja de coca del consumo ilegal de cocaína resulta fundamental para el ámbito forense y laboral. En esta publicación se hace una reseña de los trabajos de investigación que se están desarrollando en orina y pelo y de la propuesta de dos alcaloides de la hoja de coca: higrina y cuscohigrina para diferenciar los mascaradores de hoja de coca de los consumidores de cocaína.

■ **Nélida Cristina Rubio**

Laboratorio de Toxicología. Cipolletti, Río Negro.

E-mail: cristinarubio2@gmail.com

In Argentina the practice of chewing coca leaves or “coquear” is not prohibited and it is widespread not only among the indigenous population of our country, its use has reached all levels of society. The differentiation of ancestral use of coca leaf of cocaine abuse is essential for workplace drug and forensic. This publication presents an overview of the research being carried out in urine and hair, the proposed of two alkaloids of coca leaf is made.

■ INTRODUCCION

La hoja de coca ha tenido una historia controversial y como algunos mencionan tiene dos caras al igual que una moneda.

El lado benévolo de la hoja de coca viene representado por su uso más conocido el “masticatorio” o el “coqueo” o también por su ingesta a través de infusiones; el ceremonial que viene de la época del incanato; su uso medicinal por sus bondades terapéuticas; el adivinatorio, los curanderos siguen presagiando la

suerte a través de la hoja de coca; como moneda de cambio y en las ceremonias funerarias en la época prehispánica como lo han demostrado los hallazgos arqueológicos en 1999 en el noroeste de Salta, cerca del volcán Lullailaco a 6739 msnm y conocidos como los “Niños del Lullailaco”.

El escritor peruano Ciro Alegría (1909-1967) en su novela sobre el indio peruano “El Mundo es ancho y ajeno” (Alegría, 2016), hace la siguiente consideración de la hoja de coca:

“Los comuneros, naturalmente, conocían la dulce coca. Compraban las fragantes hojas de color verde claro en las tiendas de los pueblos o alguno incursionaba para adquirirlas en los valles cálidos donde se cultivan. Al macerarlas con cal, se endulzan y producen un sutil enervamiento o una grata excitación. La coca es buena para el hambre, para la sed, para la fatiga, para el calor, para el frío, para el dolor, para la alegría, para todo es buena. Es buena para la vida. A la coca preguntan los brujos y quien desee catipar; con la coca se obsequia a los cerros, laguna

y ríos encantados; con la coca sanan los enfermos; con la coca viven los vivos; llevando coca entre las manos se van los muertos. La coca es sabia y benéfica”.

La insalivación de la hoja de coca o “coqueo” es una práctica que algunos consideran anterior al Imperio Incaico (1400 hasta aproximadamente 1533) y que consiste en ensalivar el bolo de hojas que se conforma y se sostiene en los carrillos, durante unas dos o tres horas aproximadamente, momento en que se procede a eliminar dicho bolo o “acullico” para volver a formar otro con hojas nuevas. Regularmente se emplea una sustancia alcalina llamada llicta o yesta o lipta que favorece la extracción de los alcaloides de la hoja de coca y mejora el sabor amargo de éstos. Hoy es común su

reemplazo por el bicarbonato que es característico del acullico argentino.

Esta práctica del acullico se ha mantenido sin modificaciones a través de los siglos, como describió Américo Vespucio en 1504:

“.... Su rostro y sus gestos eran lo más desagradables que se puedan imaginar; todos ellos tenían las mejillas infladas por una hierba verde que ellos rumiaban como bestias, al punto que apenas podían hablar. Cada uno de ellos llevaba colgadas a su cuello dos calabazas secas que estaban llenas, una con la planta que tenían en la boca y la otra con una harina blanca que parecía polvo de huesos reducidos, de tiempo en tiempo, ellos introducían en la harina un palito que antes humedecían con su saliva y se lo llevaban en se-

guida a la boca...”

El coqueo es una práctica todavía vigente en el mundo andino e incluso parece haber un crecimiento del consumo entre los integrantes de las diferentes capas sociales de la población urbana del Noroeste argentino, especialmente en las provincias de Salta y Jujuy (Santoni y Torres).

Con la llegada de los españoles a América la hoja de coca empezó a mostrar su otra cara. Fue considerada por la Iglesia Católica una planta diabólica vinculada a la idolatría contraria al cristianismo e intentaron la prohibición de su uso. Al final los españoles y la Iglesia terminaron aceptando su empleo por su conveniencia, los primeros porque empleaban indígenas en la explotación



Figura 1: La diferencia entre un hábito cultural y el consumo abusivo de una droga.

de las minas y el coqueo les permitía estar varios días trabajando casi sin comer ni beber y los segundos porque los nativos debían pagar los diezmos eclesiásticos que lo hacían con hojas de coca que era empleada como una forma de moneda en las zonas andinas. (Rosasco y Zambrano, 2011).

La hoja de coca cayó otra vez en desgracia a partir del descubrimiento de la cocaína en el siglo XIX por Albert Nieman (1858). Nuevamente la planta sagrada que había sido empleada milenariamente por los pueblos andinos pasó a ser condenada y maldecida por los efectos nocivos del empleo de la cocaína que nada tienen que ver con el uso tradicional de la hoja de coca. (Figura 1).

En 1953 el Comité de Expertos de la OMS sobre las drogas sujetas a producir adicción concluye que: "...mascar hojas de coca está cercano a las características de la adicción...debe ser definida y tratada como una adicción".

En marzo de 1961 se firma en Nueva York la Convención Única de Estupefacientes, cuyo artículo 49 estipula la prohibición de la masticación de la hoja de coca dentro de un plazo de 25 años. Argentina adhirió a esta convención pero con reservas a este artículo.

Luego de la resistencia de los legisladores del noroeste argentino en no aceptar que se impusiera una reforma a una costumbre tradicional como el coqueo (Abduca y Metaal, 2013), se aprueba en 1989 la Ley Federal de Estupefacientes 23.737, modificada por la Ley Federal 26.052 (2005) que establece en su artículo 15:

"La tenencia y el consumo de hojas de coca en su estado natural, destinado a la práctica del coqueo

o masticación, o a su empleo como infusión, no será considerada como tenencia o consumo de estupefacientes."

Sin embargo, el cultivo de la hoja de coca, está prohibido en la Argentina (esta situación es diferente en países como Bolivia o Perú).

En 2007 la Declaración de las Naciones Unidas sobre los Derechos de los Pueblos Indígenas manifiesta que deben respetarse sus tradiciones culturales y prácticas medicinales, lo que vuelve a la necesidad de analizar la prohibición de la práctica del coqueo establecida por la Convención Única de Estupefacientes de 1961.

Esta pequeña introducción tiene el objetivo de contextualizar el significado de la hoja de coca en la región andina y en nuestro país, mostrar que su uso tradicional ya no está sólo circunscrito a los indígenas o a las clases sociales bajas sino que la costumbre de coquear se ha extendido a toda la sociedad.

■ INVESTIGACIONES RECIENTES:

El laboratorio de toxicología en algunas circunstancias tiene la necesidad de responder si un resultado positivo a cocaína de una muestra biológica, orina principalmente, es como consecuencia de un individuo que ha coqueado, tomado una infusión o bien es un consumidor de cocaína. Diferencia que resulta importante cuando los análisis se hacen con fines laborales o forenses. En el primer caso puede significar ingresar o no a un trabajo o ser echado del mismo, en el segundo enfrentar por ejemplo algún proceso en la Justicia Penal o la pérdida de la custodia de un menor en la Justicia Civil.

¿Podrían algunos compuestos

existentes en la hoja de coca perderse total o parcialmente en el método ilegal de obtención de cocaína? ¿Podrían esos compuestos ser extraídos durante el coqueo? Estas fueron algunas de las preguntas que se plantearon al iniciar la investigación orientada a diferenciar el mascador de hoja de coca del consumidor de cocaína.

La concentración de los alcaloides en la hoja de coca es variable, no se distribuyen homogéneamente en la hoja, varían según el tiempo de la cosecha, la edad de la planta y de la hoja, composición del suelo, la especie y variedad de la planta de coca. Los principales alcaloides reportados en la hoja de coca son: cocaína, cinamoilcocaína, metilecgonina, higrina, cuscohigrina. Otros, como tropinona y tropococaína, se encuentran en menores concentraciones. (Johnson y Emche, 1995) (Figura 2)

Higrina [(1-metilpirrolidin-2il)-propan-2-ona] y cuscohigrina [1,3-bis-(1-metil-pirrolidin-2il)-propan-2-ona] (Figura 3) no eran alcaloides reportados en la bibliografía en las muestras de secuestros de calle de cocaína ni en muestras biológicas positivas a cocaína como sangre, orina o pelo. Mientras que los restantes alcaloides como metilecgonina (originado también como metabolito de la cocaína), cinamoilcocaína, incluso tropinona o tropococaína eran hallados junto a la cocaína.

La ausencia de higrina y cuscohigrina podría deberse a que no fueran compuestos incluidos en las rutinas de búsqueda de los laboratorios de toxicología, por su dificultad para obtenerlos como testigos (no figuran en los listados estándares de los catálogos comerciales), o bien porque la higrina y cuscohigrina fueran eliminadas parcial o totalmente en al-

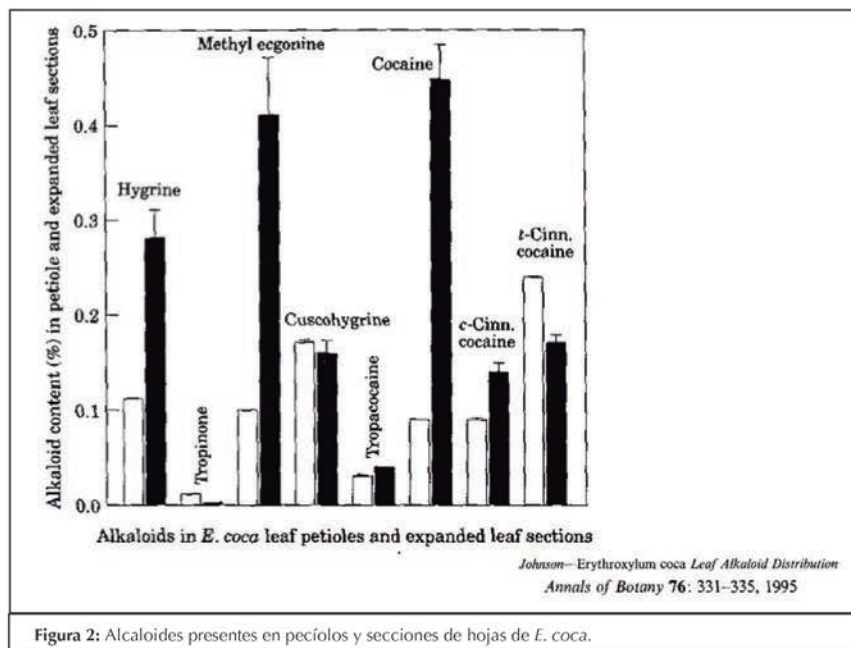


Figura 2: Alcaloides presentes en pecíolos y secciones de hojas de *E. coca*.

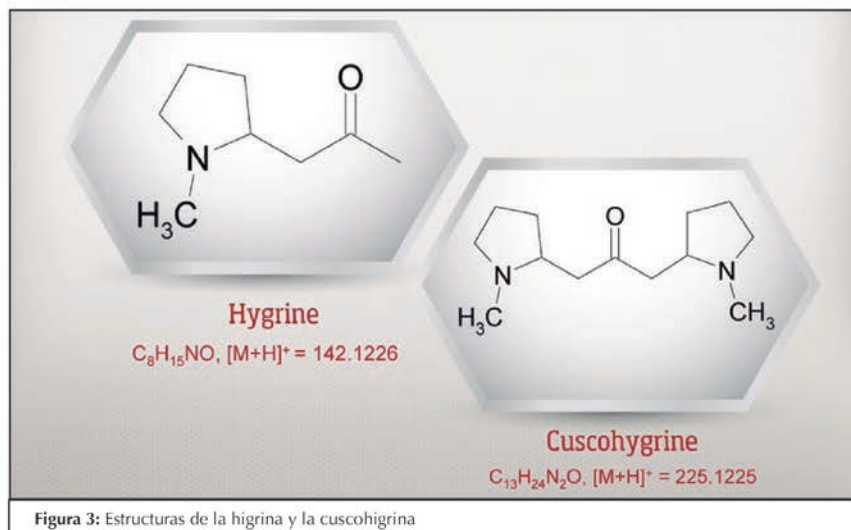


Figura 3: Estructuras de la higrina y la cuscohigrina

guna de las etapas de la producción clandestina de cocaína.

Podemos considerar dos procedimientos de extracción de la hoja de coca. Uno, en los laboratorios clan-

destinos con el empleo de hidrocarburos (kerosene, acetona, éter) y compuestos químicos como ácido sulfúrico y clorhídrico, cal, permanganato etc., que involucra varias etapas y el otro que se realiza en la

boca a través de la insalivación con o sin el agregado de una sustancia alcalina, en un solo paso.

Los métodos publicados para producir cocaína a partir de hojas

Tabla 1: Áreas de pico relativas (GC-MS) de los alcaloides de la coca determinados para los pasos de extracción de la hoja de coca A, B, C y D.						
Paso	Descripción	Área de pico GC-MS, %*				
		COC	EME	CIN	HYG	CUS
A	Hoja de coca fresca seca	84,3	4,7	5,8	2,4	2,8
B	Hoja de coca extraída	5,4	41,0	n.d.	23,7	29,9
C	Re-extracto ácido con kerosene	78,4	0,14	20,2	0,29	0,97
D	Pasta de coca	96,9	n.d.	3,1	n.d.	n.d.
*. Promedio de cuatro extracciones, relativo a la suma de las áreas de pico de las cinco sustancias; n.d.: no detectada.						

Tabla 2: Concentraciones de alcaloides de coca determinadas por LC-MSMS para los pasos de extracción de la hoja de coca A, B y D.							
Paso	Descripción	Concentración, % en peso					
		COC	EME	CIN	TRO	HYG*	CUS
A	Hoja de coca fresca seca	0,88	0,97	1,66	0,083	1,1	0,41
B	Hoja de coca extraída	0,007	0,05	0,047	0,013	0,77	0,48
D	Pasta de coca	79,6	3,4	16,8	0,064	0,002	0,002
*. Concentración relativa de higrina, calculada como el área del pico dividida por el área del pico EME-d3 y el peso de la muestra.							

de coca son el de extracción por solventes y la extracción vía ácida, las dos vías conducen a la producción de pasta de coca su purificación a cocaína base y su conversión a clorhidrato de cocaína. (Casale y Klein, 1993; UNODC, 2012).

El análisis cuali y cuantitativo de las distintas etapas en la producción de pasta de coca empleando la vía de extracción por solventes (Figura 4), realizado por cromatografía gaseosa con detector de masa (CG-MS) (Tabla 1) y por cromatografía líquida con detector de masa tandem (LC-MSMS) (Tabla 2) muestra que tanto higrina como cuscohigrina son eliminadas mayoritariamente en la etapa de extracción con kerosene, pasando la higrina y cuscohigrina de 1,1% y 0,41% en la hoja de coca fresca respectivamente a 0,002% en la pasta de coca, en tanto la cocaína

pasa de 0,88% en la hoja a 79,6% en la pasta de coca (Rubio y col., 2015a). Resultados similares fueron obtenidos cuando se empleó la vía ácida de producción de cocaína (Rubio y col., 2015a, 2015b)

Esta mayor hidrofiliidad y menor solubilidad de la higrina, cuscohigrina y en alguna medida de la metilecgonina en kerosene pueden ser explicadas por su coeficiente de partición octanol/agua (Pow): $3,08 \pm 0,38$ para cocaína y sólo $0,28 \pm 0,27$, $0,72 \pm 0,35$ y $0,23 \pm 0,37$ para higrina, cuscohigrina y metilecgonina respectivamente.

Los estudios realizados previamente en muestras biológicas de orina y pelo confirman los resultados anteriores (Rubio y col., 2013, 2014, 2015). En estos trabajos se analizaron dos poblaciones: una de masca-

dores de hoja de coca, voluntarios del noroeste argentino y la otra, una población de consumidores de cocaína detenidos por causas penales en España y Alemania (en Europa no está permitido el mascado de hojas de coca) y algunos consumidores de Argentina. (Tabla 3). En la Tabla 4 se describen la edad, sexo, actividad, años y frecuencia de mascado de los "coqueros" voluntarios. En este muestreo poblacional se confirma que el mascado de hoja de coca se sostiene a través de los años y que ha infiltrado a todas las clases sociales.

Se detectó cualitativamente higrina y cuscohigrina en todas las muestras de orina de los mascadores de hoja de coca, siendo negativo el resultado para las orinas de los consumidores de cocaína. Se empleó cromatografía gaseosa-es-

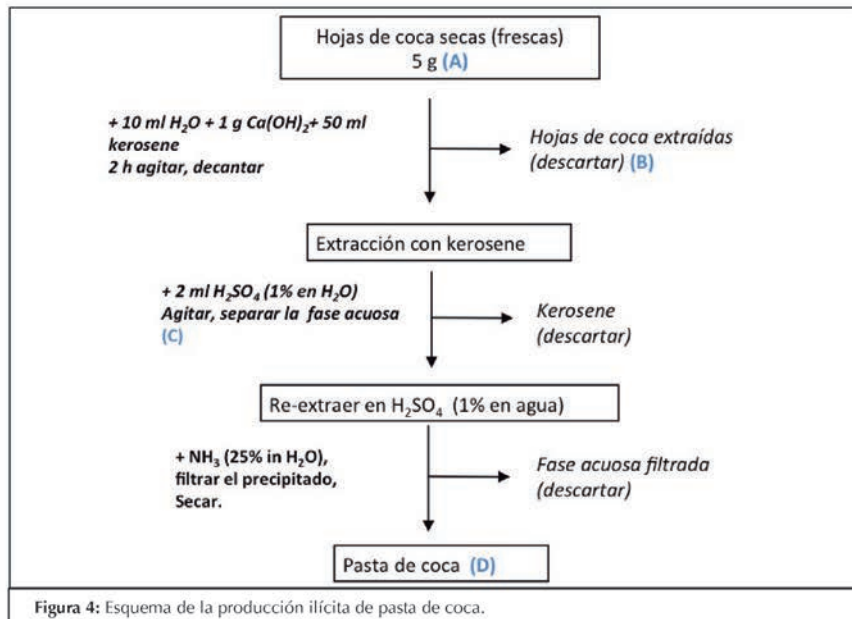


Figura 4: Esquema de la producción ilícita de pasta de coca.

Tabla 3: Detalle de las muestras analizadas de individuos que mascan hojas de coca y de consumidores de cocaína.

MASCADORES DE HOJA DE COCA			CONSUMIDORES DE COCAÍNA		
24 muestras de orinas 4 mujeres, 20 varones		26 muestras de pelo 4 mujeres, 22 varones	39 muestras de orinas 4 mujeres, 34 varones		22 muestras de pelo 10 mujeres, 12 varones
Edad	18 a 73		País	Argentina y España Alemania (Berlin)	
Ocupación	Médicos, químicos, atletas, pintores, técnicos, enfermeros, albañiles, jubilados.		Edad	23 a 56 23 a 52	
Tiempo de coqueo (años)	2 a 44		Antecedentes	Tráfico de drogas, robo, homicidio, consumidores, suicidios Tráfico de drogas, consumidores, accidentes	
Frecuencia	Varias veces por día (10 a 60 grs.) , una vez por día, una vez por semana, una vez por mes.				
Uso de alcali	16	19			

Tabla 4: Descripción de los mascadores de hoja de coca analizados (Int. J. Legal Med. 2015 129: 69).

Voluntario No.	Edad, género	Profesión	Años mascado	Frecuencia	Cantidad g(hoja)
1	43m	Médico	23	varias/día	10
2	73f	Jubilado	44	Una/semana	5
3	18m	Estudiante	2	Una/semana	10
4	70f	Jubilado	10	varias/día	10
5	43f	Bioquímico	3	Una/semana	5
6	47m	Enfermero	?	varias/día	50
7	44m	Empleado	?	varias/día	15
8	43m	Médico	10	Una/semana	10
9	42m	Conductor	26	varias/día	10
10	59m	Cerrajero	30	Una/día	50
11	60m	Empleado	20	varias/día	50
12	25m	Deportista	6	varias/día	60
13	20m	Albañil	2	varias/día	50
14	58m	Electricista	24	varias/día	50
15	27m	Insp. de tránsito	10	Una/día	5
16	29m	Conductor	10	Una/día	4
17	48m	Electricista	36	Una/día	4
18	58m	Sereno	30	varias/día	5
19	64m	Técnico	5	varias/día	3
20	29m	Albañil	10	varias/día	7
21	32m	Pintor	16	varias/día	5
22	60m	Pintor	10	Una/día	5
23	53m	Mecánico	10	Una/mes	5
24	37m	Trabajador social	10	varias/día	30
25	66f	Jubilado	12	varias/día	300/día
26	??m	Conductor	?	varias/día	20/día

Tabla 5: Resultados en orina de los alcaloides de la hoja de coca en mascadores de hoja de coca y consumidores de cocaína (Forensic Sci. Int. 2014, 243: 30).

CG-MS · LD (CUS)=100 ng/m (cualitativo) ORINA					
	Coca Chewers		Consumers		
	POSITIVOS	%	POSITIVOS	%	
CUSCOHYGRINE	24/24	100	0/38	0	
HYGRINE	24/24	100	0/38	0	
CINAMOYLCOCAINE	19/24	79.17	1/38	2.63	
COCAINE	19/24	79.17	27/38	71.05	
EME	24/24	100	38/38	100	

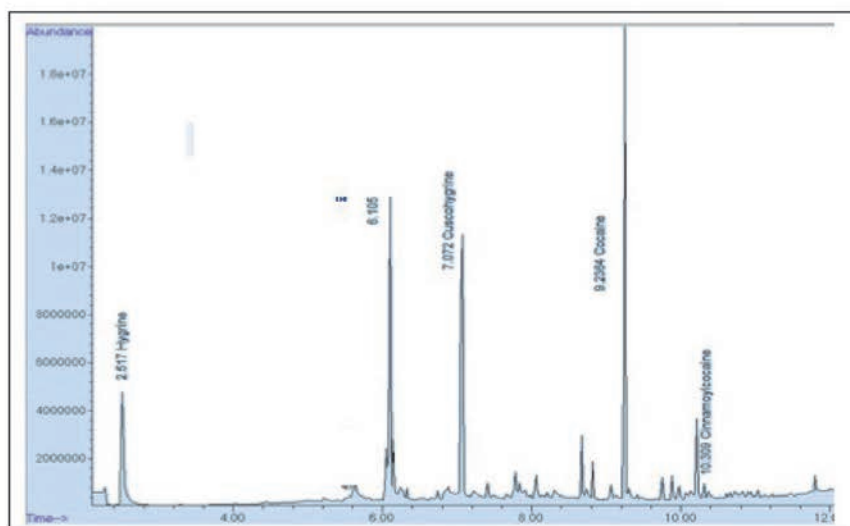


Figura 5: Muestra de orina de un mascador de hoja de coca. Análisis por GC-MS modo scan. Higrina (RT= 2,527); EME (Metilecgonina) (RT=6,105); Cuscohigrina (RT=7,072); Cocaína (RT=9,236); Cinnamoilcocaína (RT= 10,309).

pectrometría de masa previa extracción líquido-líquido de la muestra de orina, con un límite de detección de 100 ng/ml y de 10 ng/ml por cromatografía líquida masa tándem (LC-MSMS) (Tabla 5 y Figura 5). La cinamoilcocaína es otro alcaloide

que se encontró en proporción alta en la orina de los coqueros y sólo en uno de un total de 38 consumidores. La cinamoilcocaína es destruida por el uso de permanganato de potasio en uno de los pasos finales en la producción de cocaína ilícita, no siem-

pre es empleada por los laboratorios clandestinos por lo que su hallazgo en muestras biológicas no es infrecuente. (Rubio y col., 2013).

El pelo es una matriz aceptada para el análisis de drogas de abuso

Tabla 6: Relaciones de concentración alcaloides de coca/cocaína y metabolito de cocaína/cocaína en pelo de mascadores de coca y consumidores de cocaína.

Relación de concentraciones	Mascadores de coca			Consumidores de cocaína			ANOVA		
	Rango	Media	Mediana	Rango	Media	Mediana	a	F	Diferencia significativa
CIN/COC	0,008-0,243	0,087	0,076	0,000-0,034	0,009	0,008	0,000	53,495	Si
TRO/COC	0,0004-0,0201	0,0028	0,0015	0,0001-0,0223	0,0042	0,0027	0,218	1,547	No
HYG/COC*	0,0002-0,031	0,0090	0,0041	0,000-0,0032	0,0004	0,0002	0,000	26,917	Si
CUS/COC	0,002-0,014	0,098	0,034	0,000-0,036	0,004	0,002	0,000	15,394	Si
NC/COC	0,003-0,037	0,013	0,095	0,001-0,054	0,021	0,019	0,030	4,968	Si
BE/COC	0,19-1,45	0,47	0,56	0,00-0,84	0,18	0,26	0,000	13,504	Si
EME/COC	0,0097-0,160	0,057	0,048	0,001-0,072	0,0088	0,0066	0,000	46,017	Si
CE/COC	0,000-0,722	0,118	0,061	0,000-0,201	0,034	0,080	0,004	9,176	Si

*. Para la higrina, el área de pico/mg de cabello se corrigió en relación con el estándar interno EME-d3 utilizado para la comparación. Tres casos de mascadores de coca con picos altos de higrina no se incluyeron (relación: 3,02, 1,13 y 0, 144).

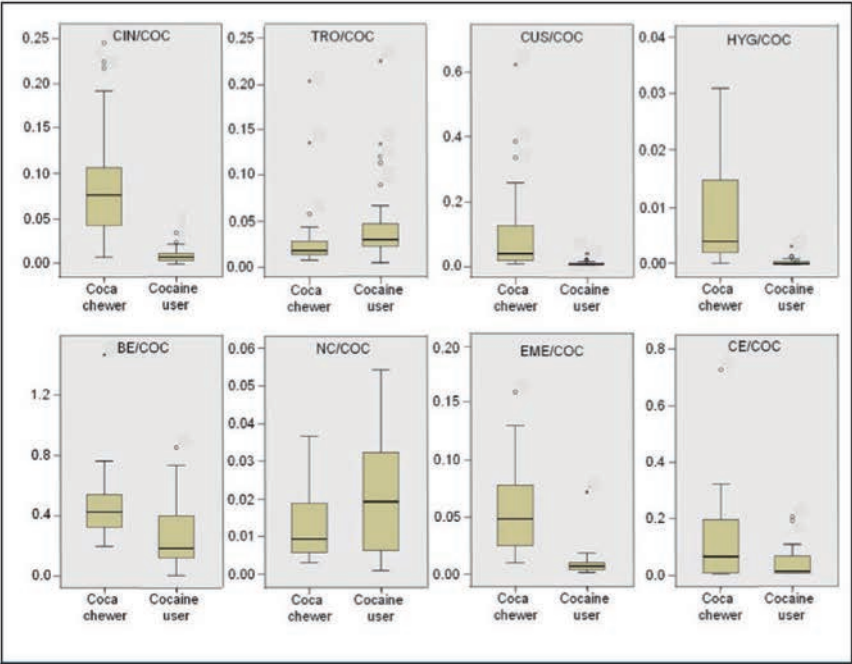


Figura 6: Representación gráfica “Box and whiske” de las relaciones de concentración de otros alcaloides de la coca y metabolitos de la cocaína respecto de la cocaína en pelo, comparando entre mascadores de hojas y consumidores de la droga.

incluido cocaína y sus metabolitos como benzoilecgonina y metilecgonina. La investigación de la presencia de higrina y cuscohigrina en pelo permitió establecer que esta matriz resulta útil para diferenciar consumidores de cocaína de mascadores de hoja de coca. (Rubio y col., 2015). En el análisis de pelo se investigaron además de la cocaína sus metabolitos: norcocaína (NC), benzoilecgonina (BE), cocaetileno (CE), metilecgonina (EME) (es también un alcaloide de la hoja de coca) y alcaloides provenientes de la hoja de coca: cuscohigrina (CUS), higrina (HYG), cinamoilcocaína (CIN), tropococaína (TRO). Se empleó LC-MSMS que permitió trabajar con límites de detección para los alcaloides analizados en el rango de 0,02 pg/mg a 0,97 pg/mg y con un límite de cuantificación para cuscohigrina de 3 pg/mg.

La **Tabla 6** detalla el rango, la

media y mediana de la relación de concentración de los metabolitos y alcaloides de la hoja de coca con la cocaína, de mascadores de hoja de coca y consumidores de cocaína y su nivel de significación. Con excepción de la TRO/COC las restantes relaciones muestran diferencias significativas, las mayores diferencias significativas corresponden a: CIN/COC, CUS/COC; HYG/COC y EME/COC, graficado en el Diagrama Box and Wisker (**Figura 6**). La presencia de higrina y cuscohigrina en el pelo de alguno de los consumidores de cocaína y en baja concentración corrobora que la higrina y cuscohigrina se pierde mayoritariamente en los primeros pasos de la producción clandestina de cocaína.

El empleo de cromatografía líquida masa con tiempo de vuelo (LC-QTOF-MS) permitió identificar dos metabolitos de la cuscohigrina CUS-1 y CUS-2 cuyas estructuras

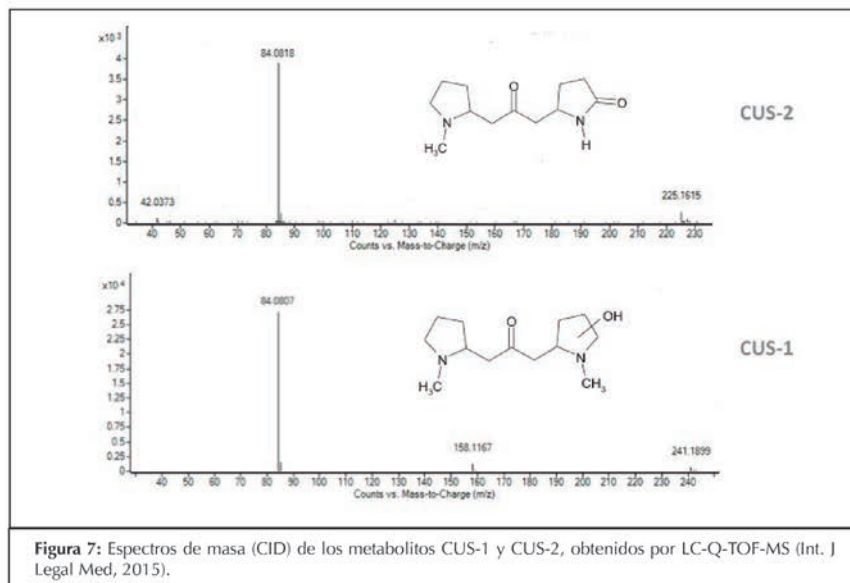
propuestas se muestran en la **Figura 7**. Ambos metabolitos fueron detectados en todas las muestras de pelo de los mascadores de coca no así en las muestras de pelo de los consumidores de cocaína. En las **Figuras 8 y 9** se muestran cromatogramas en LC-MSMS comparativos.

■ CONCLUSIONES:

De los estudios realizados y publicados hasta el presente:

1. La higrina y la cuscohigrina son potencialmente buenos marcadores para diferenciar mascadores de hoja de coca de consumidores de cocaína, ya que se pierden en un gran porcentaje en el paso de extracción de las hojas de coca (alcalinas) con kerosene.

2. La orina es una muestra apropiada para diferenciar mascadores de hoja de coca de consumidores



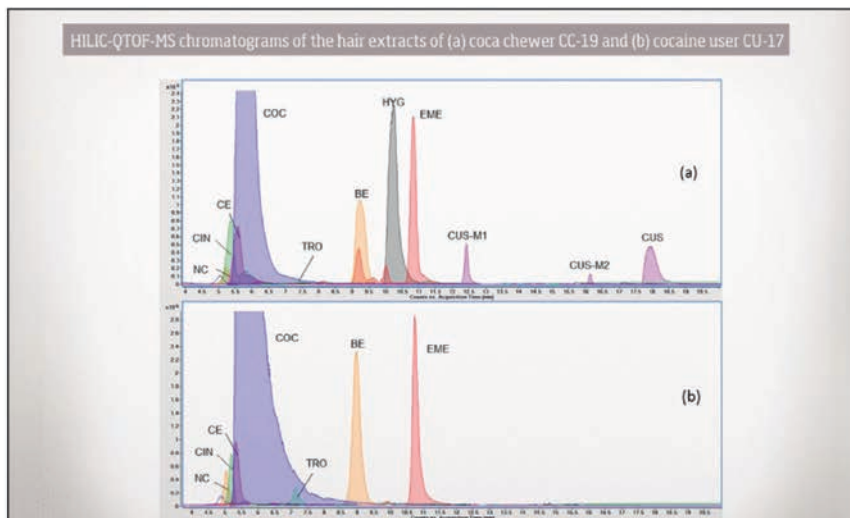


Figura 8: Cromatogramas de extractos de pelo de un mascarador de hojas de coca (a) y de un consumidor de cocaína (b).

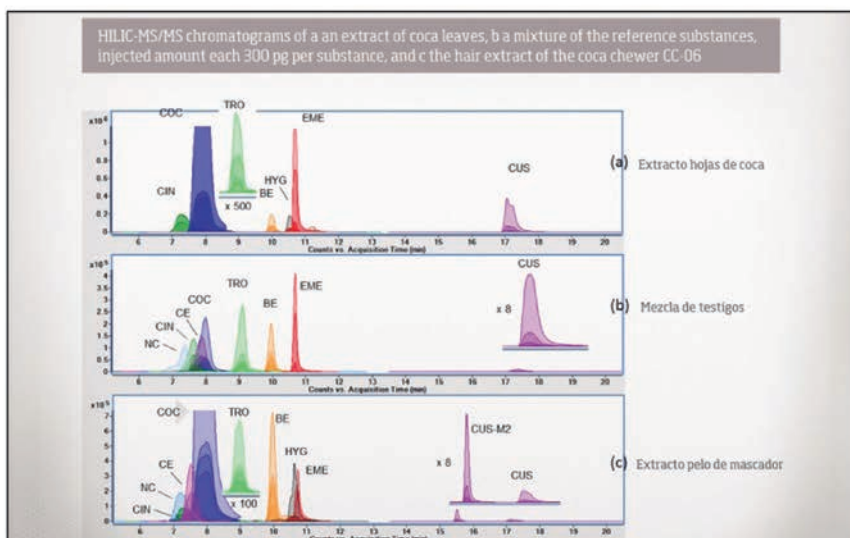


Figura 9: Cromatogramas de un extracto de hojas de coca (a); de una mezcla de sustancias de referencia (b); y de un extracto de pelo de un mascarador de hojas de coca (c).

de cocaína recientes a través de la búsqueda de higrina y cuscohigrina y secundariamente, por la presencia de cinamoilcocaína. El método propuesto en los trabajos por cromatografía gaseosa-masa mencionados previamente resulta ser sencillo, rápido y con sensibilidad adecuada para hacer la diferencia entre estas dos poblaciones.

3. El pelo sería una muestra adecuada para determinar si un individuo tiene la costumbre de mascar hojas de coca, empleando como criterios preliminares y en forma conjunta:

a.- Las relaciones: $CIN/COC > 0,02$, $CUS/COC > 0,01$, $EME/COC > 0,015$ para HYG/COC falta determinar el rango, los estudios realizados no contaban con un testigo certificado de higrina.

b.- Más la presencia de los dos metabolitos de la cuscohigrina CUS-M1 y CUS-M2.

c.- Es un requisito para emplear estas relaciones que en el método de preparación de la muestra de pelo no se utilicen sustancias ácidas o alcalinas que provoquen la hidrólisis de la cocaína.

d.- Estos criterios no permiten excluir si hubo algún consumo de cocaína aislado.

1. La evaluación de la presencia de sustancias de corte de la cocaína o de otras drogas de abuso es un elemento más a evaluar tanto en orina como en pelo al momento de analizar los resultados.

2. Se requiere continuar con estos estudios a fin de hallar parámetros que permitan establecer cuando el individuo que masca hojas de coca también consume ilegalmente cocaína.

Agradecimientos: a los Dres. Ana M. Bermejo (Universidad de Santiago de Compostela-Galicia), Sabina Strano Rossi (Universidad de Sacro Cuore- Roma), Fritz Pragst (Universidad de Charité-Berlín); Jorge González (Médico laboral)

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Abduca R, Metaal P. (2013). Había un mercado legal para la coca: el caso del coqueo argentino. Transnational Institute. Serie reforma legislativa en materia de drogas No. 23. Disponible en: https://www.tni.org/files/DLR_23_klein_def2.pdf.
2. Alegría C. Libro: El mundo es ancho y ajeno. <http://www.portalalba.org/biblioteca/ALEGRIA%20CIRO.%20El%20Mundo%20es%20Ancho%20y%20Ajeno.pdf>. (consulta: enero de 2016).
3. Casale JF, Klein RFX. (1993). Illicit Production of Cocaine. *Forensic Sci. Rev.* 5: 95-107.
4. Johnson EL, Emche SD. (1995). Variation of alkaloid content in *Erythroxylum* coca leaves from leaf bud to leaf drop. *Ann. Bot.* 73: 645-650.
5. Ley Federal Argentina Nro. 26.052. Publicada en el Boletín Oficial en Agosto de 2005.
6. Novák M, Saleminck CA, Khan I. (1984). Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum* coca and *Erythroxylum novogranatense*. *J. Ethnopharmacol.* 10: 261-274.
7. Rosasco CCh, Zambrano GB. (2011). Coca La hoja sagrada de los Incas La Verdadera Historia. Editorial PIKI E.I.R.L.
8. Rubio NC, Strano-Rossi S, Tabernero MJ, Anzillotti L, Chiarotti M, Bermejo AM. (2013). Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Sci. Int.* 227: 60-63.
9. Rubio NC, Strano-Rossi S, Tabernero MJ, González JL, Anzillotti L, Chiarotti M, Bermejo AM. (2014). Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 243: 30-34.
10. Rubio NC, Hastedt M, González J, Pragst F. (2015). Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. *Int. J. Legal Med.* 129: 69-84.
11. Rubio NC, Thurmann D, Krumbiegel F, Pragst F. (2015a). Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast to cocaine abuse. Póster presentado en 53rd TIAFT Meeting 2015, Florencia, Italia (en prensa).
12. Rubio NC, Márquez C, Confalonieri A, Castiglione JL. (2015b). La eliminación de la higrina y cuscohigrina en las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascadore de hoja de coca de consumidores de cocaína. Póster presentado en XI Congreso Latinoamericano de Toxicología Forense (XI TIAFT 2015), Arequipa,



V-CONCLUSIONES Y PROPUESTAS

Capítulo 7





7.

CONCLUSIONES Y PROPUESTAS

«La ciencia nunca resuelve un problema
sin crear otros 10 más».

“Science never solves a problem
without creating 10 more.”

George Bernard Shaw.

Como escribí al inicio de esta tesis, entregar el trabajo final no es terminar la investigación sino haber culminado con una etapa. Como dice Shaw G.B. (dramaturgo, crítico y polemista irlandés): «La ciencia nunca resuelve un problema sin crear otros 10 más».

Es imposible adentrarse en el mundo del conocimiento y no darnos cuenta de que desconocemos mucho más de lo que creíamos saber.

Pudimos resolver algunas dudas, pero hemos encontrado muchas otras y seguramente al interesado en este tema se le ocurrirán otras tantas, contrariamente a sentirnos desanimados es una invitación a continuar trabajando.

As I wrote at the beginning of this thesis, to deliver the final work is not to finish the investigation but to have finished with a stage. As George Bernhard Shaw (Irish playwright, critic and polemicist) wrote: “Science never solves a problem without creating 10 more.”

It is impossible to enter the world of knowledge and not realize that we do not know much more than we thought we knew.

We were able to resolve some doubts, but we have found many others and surely, the person interested in this topic will think of many others. However, contrary to feeling discouraged, it is an invitation to continue working.

7-1 AVANCES (7-1 PROGRESS)

1. Iniciamos esta investigación tratando de dilucidar cómo discernir si el resultado positivo a cocaína en una muestra de orina se debía a un consumo legal, como el mascado de hojas de coca o beber té de coca que es una práctica aceptada en algunos países de Latinoamérica, o a un consumo ilegal. **Respondimos a nuestro objetivo inicial: hallamos dos alcaloides de las hojas de coca HIGRINA Y CUSCOHIGRINA, que resultaron hábiles para poder determinar si un individuo ha consumido hojas de coca sea porque las ha mascado o bebido té de coca y que no se encuentran o son no detectables en quienes consumen ilegalmente cocaína.**

We started this investigation trying to elucidate how to discern whether a positive result for cocaine in a urine sample was due to legal consumption, such as chewing coca leaves or drinking coca tea, which is an accepted practice in some Latin American countries, or illegal consumption of manufactured cocaine. As a solution of our initial objective, we found two alkaloids of the coca leaves HYGRINE and CUSCOHYGRINE, which were detected if an individual had consumed coca leaves either by chewing or by drinking coca tea, and which are not detectable in those who used illegal cocaine preparations.

2. Encontramos que otras matrices de uso en forense o laboral y también en doping resultaron útiles como el fluido oral (para detectar consumos recientes) o el análisis de pelo para determinar un consumo crónico en mascadores de hojas de coca frecuentes.

We found that other matrices which are frequently tested in forensic or work place drug testing and also in doping control were useful in the same context: oral fluid (to detect recent consumption) or hair analysis to determine chronic consumption in frequent coca leaf chewers.

3. Los estudios de investigación se realizaron sobre varias matrices y empleando técnicas de separación y tecnología variada lo que nos ha permitido ir confirmando los resultados y llegar a comprobar la utilidad de los alcaloides: higrina y cuscohigrina.

The studies were carried out on coca leaves, urine, saliva and hair by using

chromatographic separation techniques in combination with mass spectrometric technology, which has allowed to confirm the results and to verify the usefulness of the alkaloids: hygrine and cuscohygrine as markers for use of unprocessed coca leaves.

4. Mostramos en una investigación de producción ilegal de cocaína a partir de hojas de coca, que la higrina y cuscohigrina no son detectadas o solo en cantidades trazas. Esto explica su ausencia en la cocaína ilegal y su utilidad como marcador específico de mascado de hojas de coca y de té de coca.

We could show in an investigation of the illegal cocaine production that the coca alkaloids hygrine and cuscohygrine are not or only in traces extracted during the ligroin processing of coca leaves. This explains their absence in illegal cocaine and their usefulness as specific markers of coca chewing and coca tea drinking.

5. El pelo sería una matriz útil para determinar el uso legal de hojas de coca en mascadores de hoja de coca frecuentes aún en los consumidores de “PACO”, (fumadores de pasta base de muy baja calidad).

Hair appeared to be a useful matrix to determine the exclusive legal use of coca leaves in frequent coca leaf chewers, even to differentiate from “PACO” consumers (very low-quality base paste smokers).

6. La higrina y cuscohigrina son constituyentes de la hoja de coca y no son potenciales causantes de contaminación externa del pelo como la cocaína, por lo que sus resultados positivos en esta matriz excluirían esta posibilidad.

Hygrine and cuscohygrine are constituents of the coca leaf and are not potential causes of external contamination of the hair such as cocaine, therefore, false positive results of these alkaloids from external contamination in this matrix are excluded.

7. La ventana de detección en orina y fluido oral de la higrina y cuscohigrina es mayor que la de la cocaína y similar a la de la benzoi-

lecgonina, lo que sigue haciendo a la higrina y cuscohigrina muy ventajosas para poder determinar, en cualquier momento en que un ensayo de screening resulte positivo para cocaína, si el individuo analizado ha mascado o bebido té de coca.

The detection window in urine and oral fluid of hygrine and cuscohygrine is longer than that of cocaine and similar to that of benzoylecgonine. This has the advantage that hygrine and cuscohygrine can be determined at any time as long as a screening test for cocaine is positive, if the analyzed individual has chewed coca leaves or drank coca tea.

8. Otro alcaloide de la hoja de coca la cinamoilcocaína, ayuda a hacer el diagnóstico de consumo de hojas, sin ser específico, porque puede acompañar a la cocaína en algunas muestras de secuestro o alijos como contaminante. En el proceso de elaboración clandestina del clorhidrato de cocaína puede la cinamoilcocaína no ser eliminada. La cinamoilcocaína se sintetiza a partir del núcleo del tropano como la cocaína.

Another alkaloid of the coca leaf, cinnamoylcocaine, the supports the diagnosis of leaf consumption, without being specific, because it can accompany cocaine as a contaminant. In the clandestine production process of cocaine hydrochloride, cinnamoylcocaine may not be removed.

9. Que el hallazgo de nuestros dos alcaloides marcadores de consumo de hoja de coca HIGRINA Y CUSCOHIGRINA y CINAMOIL-COCAÍNA (como marcador secundario), son efectivos para determinar que una persona ha consumido hojas de coca y que esto puede hacerse extensivo a otras poblaciones no solo de Argentina sino también de Perú, Bolivia o Chile porque a pesar del gran número de especies del género *Erythroxylum*, aproximadamente 230, muchas de las cuales están aún en estudio, podemos decir que a la luz de los conocimientos actuales solo dos especies: la *Erythroxylum coca* (var. *coca* e *ipadu*) y la *Erythroxylum novogranatense* (var. *novogranatense* y *truxillense*), son las empleadas ancestralmente y para su utilización en el mascado o preparación de productos como té, licores, cereales, dulces etc. (cocaína de uso lícito) y que son también de donde se obtiene toda la cocaína ilícita

que ingresa a los mercados mundiales. Que estas dos especies de *Erythroxylum*: coca y novogranatense con sus variedades tienen los más altos contenidos de cocaína en sus hojas y que la higrina, cuscohigrina y cinamoilcocaína son alcaloides que la acompañan en porcentajes similares. Los fundamentos de esta afirmación son dados en el Capítulo 3 y 4.

The use of the two alkaloid markers of coca leaf consumption HYGRINE AND CUSCOHYGRINE as well as CINNAMOYLCOCAINE (a secondary marker), can be extended to other populations not only from Argentina but also from Peru, Bolivia or Chile. Despite the large number of approximately 230 species of the genus *Erythroxylum*, in light of current knowledge only two species: the *Erythroxylum coca* (var. *coca* and *ipadu*) and *Erythroxylum novogranatense* (var. *novogranatense* and *truxillense*), are in practical use. This concerns ancient use, use in chewing or preparing licit products such as tea, liqueurs, cereals, sweets, etc. as well as all illicit cocaine that enters world markets. These two species of *Erythroxylum*: coca and novogranatense with their varieties have the highest cocaine content in their leaves and contain the accompanying alkaloids hygrine, cuscohygrine and cinnamoylcocaine in similar percentages in different South American countries. The basis of this affirmation is given in Chapters 3 and 4.

10. Que el agregado de una sustancia alcalina durante el mascado de hojas de coca (bicarbonato o yista) aumentarían la eficiencia de extracción de los alcaloides de las hojas de coca y la absorción a través de la mucosa oral se vería favorecida por el estado no ionizado de estos compuestos. Esto quedó demostrado en los análisis de orina y pelo de mascadores de hojas de coca frecuentes.

The addition of an alkaline substance during the chewing of coca leaves (bicarbonate or yista) increases the efficiency of extraction of the alkaloids from the leaves and the absorption by the oral mucosa since it favors the non-ionized state of these compounds. This was demonstrated by higher alkaloid concentrations in urine and hair of frequent coca leaf chewers.

7-2 DIFICULTADES (7-2 DIFFICULTIES)

1. La presencia de higrina y cuscohigrina más cinamoilcocaína en orina, pelo y fluido oral nos permitiría asegurar que la persona ha mascado hojas de coca o bebido té de coca, pero no podemos asegurar que también consuma ilegalmente cocaína.

The presence of hygrine and cuscohygrine plus cinnamoylcocaine in urine, hair and oral fluid would allow us to ensure that the person has chewed coca leaves or drunk coca tea, but we cannot exclude that they also consumed illicit cocaine.

2. El pelo no sería útil para diagnosticar que una persona masca hojas de coca o bebe té de coca en forma esporádica, las concentraciones de los marcadores higrina y cuscohigrina no son detectables o están en concentraciones muy bajas difíciles de diferenciar del consumidor ilegal de cocaína.

Hair is not suitable to diagnose sporadic chewing of coca leaves or drinking coca tea, since in such cases hygrine and cuscohygrine in hair are not detectable or are in too low concentrations, for differentiation from illegal cocaine users.

3. Los mascadores de hoja de coca dan positivo al marcador de fumado de cocaína, anhidroecgonina metiléster (AEME). Por lo tanto, la utilidad de este marcador para la exclusión del consumo de pasta de coca además del consumo tradicional de hojas de coca es cuestionable y debería investigarse más a fondo.

Coca leaf chewers test positive for the cocaine smoking marker anhydroecgonine methyl ester (AEME). Therefore, the usefulness of this marker for the exclusion of coca paste smoking in addition to traditional consumption of coca leaves is questionable and should be further investigated.

4. Es difícil detectar los otros alcaloides de la hoja de coca como tropinona o tropococaína por su baja concentración en las hojas de coca, de aumentar la sensibilidad en los métodos serían compuestos que podrían ser utilizados para la diferenciación entre uso legal e ilegal de la

cocaína.

It was difficult to detect other alkaloids of the coca leaf such as tropinone or tropacocaine due to their low concentration in the coca leaves. If the sensitivity can be further increased in the methods, they could be useful for the differentiation between legal and illegal use of the cocaine.

5. No se logró obtener la síntesis de higrina durante todo el desarrollo de esta tesis. Por esta razón, no se pudo cuantificar la higrina y solo se pudieron dar concentraciones relativas. Sin embargo, la estructura de la higrina se demostró de manera inequívoca mediante el uso de LC-QTOF-MS y hojas de coca como fuente de este alcaloide.

It was not possible to obtain the hygrine reference substance throughout the time of this study. For this reason, hygrine could not be quantified and only relative concentrations could be given. However, the structure of hygrine was unambiguously proved by use of LC-QTOF-MS and coca leaves as a source of this alkaloid.

6. No hallamos antecedentes en la bibliografía sobre el tema de nuestra tesis, como así tampoco de análisis previos de la higrina y/o cuscohigrina en matrices biológicas, ni existían los testigos comerciales de estos dos alcaloides, por lo que fue necesario hacer los desarrollos de las técnicas sin orientación.

We did not find antecedents in the bibliography on the subject of our thesis, as well as previous analyzes of hygrine and / or cuscohygrine in human matrices, nor were there commercial sources of these two alkaloids, so it was necessary to carry out the developments of techniques without orientation.

7-3 PROPUESTAS (7-3 PROPOSALS)

1. Las técnicas empleadas, en especial las de extracción son un punto a ser mejoradas. Por ejemplo:

a) El empleo de otro o mezclas de solventes de extracción más eficientes para la orina.

b) Mejorar las técnicas de toma de muestra con el uso de algún dispositivo para el fluido oral.

c) Mejorar el método de extracción por precipitación de proteínas en fluido oral, para obtener extractos más limpios y de menor efecto matriz en el caso del uso de los equipos de LCMSMS.

d) Desarrollar un método de extracción y medición para detectar en plasma a la higrina y cuscohigrina.

The techniques used, especially the extraction techniques, are a point to be improved. For example:

a) The use of a more efficient extraction solvent mixture for urine.

b) Improvement of the sampling techniques for oral fluid.

c) Improvement of the method of protein precipitation in oral fluid, to obtain cleaner extracts with less matrix effect for LC-MS/MS measurement.

d) Development of an extraction and measurement method for hygrine and cuscohygrine in plasma.

2. Profundizar los estudios de estabilidad de la higrina y cuscohigrina, medios de conservación y productos de degradación o metabolización en las distintas matrices.

To deepen the studies about the stability of hygrine and cuscohygrine, about methods of conservation in the samples and about products of degradation or metabolization in the different matrices.

3. Desarrollar métodos de screening en orina o fluido oral específicos para la higrina y cuscohigrina para rápidamente en un análisis in situ (control laboral o en rutas) se pueda poner de manifiesto un consumo legal de hojas de coca en los países cuyo uso es admitido.

Development of specific urine or oral fluid screening methods for hygrine and cuscohygrine so that an in-situ analysis (workplace or road site control) can quickly reveal a legal consumption of coca leaves in countries where the use is permitted.

4. Para poder asegurar que un mascador de hojas de coca o bebedor de té de coca no hace además uso de cocaína ilegal, es necesario hallar un marcador de consumo de cocaína, tal vez algún compuesto (by-products) que se origine durante la producción ilegal de cocaína.

In order to ensure that a coca leaf chewer or coca tea drinker does not also use illegal cocaine, it is necessary to find a marker of cocaine consumption. This could be some compound (by-products) that originates from the illegal production of cocaine.

5. Seguir investigando sobre la presencia de la anhidro ecgonina metil éster (AEME) en los que usan hojas de coca, a efectos de poder hacer una clara diferencia con el fumador ilegal de pasta base o cocaína base, dado que el AEME es un marcador en este tipo de población.

Further investigations about the presence of anhydroecgonine methyl ester (AEME) in consumers of coca leaves, in order to be able to make a clear difference from illegal smokers of base paste or base cocaine, since AEME is a marker of cocaine smoking.

6. Estudiar los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de la higrina y cuscohigrina, siendo que sobre estos dos compuestos no se tienen datos sobre su farmacocinética. Esto incluye el desarrollo de un método con alta sensibilidad para estos dos analitos en plasma y una explicación de por qué la cuscohigrina no fue detectada en plasma en el estudio preliminar mostrado en el capítulo 6.7.

Study of the processes of absorption, distribution, metabolism and excretion of hygrine and cuscohygrine, since there are no pharmacokinetic data of these two compounds until now. This includes the development of a method with high sensitivity for these analytes in plasma and an explanation for the missing detectability of cuscohygrine in plasma in the preliminary study of chapter 6.7.

7. La higrina y cuscohigrina no parecerían compuestos que puedan ser considerados contaminantes externos del pelo, por lo que los resultados positivos a estos dos alcaloides en esta matriz no darían lugar a inconvenientes en su interpretación, esta afirmación debe seguir siendo estudiada.

Further studies to exclude the occurrence of external contamination of hair of coca chewers by hygrine and cuscohygrine, in order to avoid any inconve-

nience in the interpretation of positive results for these two alkaloids in this matrix.

Espero con esta tesis iniciar el camino de la solución a un problema que se hace cada vez más crítico para el ámbito judicial, laboral y del deporte, en aquellos países de Sudamérica donde la hoja de coca sigue formando parte nuestras vidas y nada tiene que ver con el fenómeno nocivo, placentero y complicado del consumo de cocaína en occidente. Además, que esta tesis sea presentada en el ámbito académico de España tal vez contribuya humildemente a aclarar el falso concepto que muchas personas aún tienen, de equiparar el uso de la coca con el de la cocaína y no comprender las diferencias farmacológicas y culturales entre estas dos sustancias relacionadas pero únicas y buscar un camino para el no uso de la cocaína con fines recreativos que no sea tratando de prohibir el uso milenario de la planta de coca en la cultura andina. El aporte de estos dos marcadores higrina y cuscohigrina, ayudarán a diferenciar el uso ilegal de cocaína manufacturada con fines recreativos, sin perseguir el antiguo uso de la planta de coca.

With this thesis, I hope it was intended to start the path of solution to a problem that became increasingly critical in the fields of justice, working and sports in those countries in South America where the coca leaf continues to be part of our lives and has nothing to do with the harmful, intoxicating and complicated phenomenon of cocaine use in the west. Furthermore, the fact that this thesis is presented in the academic sphere of Spain may perhaps humbly contribute to clarifying the false concept that many people still have, of equating the use of coca with that of cocaine and not understanding the pharmacological and cultural differences between them. The contribution of these two markers, hygrine and cuscohygrine, will help to differentiate the illegal use of manufactured cocaine for recreational purposes without pursuing the ancient use of the coca plant.





VI-ANEXO





CALIDAD DE LAS PUBLICACIONES Y CONTRIBUCIÓN DEL DOCTORANDO A LAS MISMAS

REVISTA	AÑO	TÍTULO	CUARTIL	FACTOR DE IMPACTO	CITAS	ISSN
Forensic Science International	2013	Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing.	Q2	IF2, 395	7	0379-0738
Forensic Science International	2014	Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases.	Q1	IF2, 140	6	0379-0738
Forensic Science International	2019	Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco" (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations.	Q1	IF2, 108	2	0379-0738
Drug Testing and Analysis	2017	Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse.	Q1	IF3, 345	4	EISSN 1942-7611
Int J Legal Med	2015	Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios.	Q1	IF2, 862	9	0937-9827 EISSN 1437-1596
Journal of Analytical Toxicology	2019	Development of a Reliable Method for Assessing coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC-MS-MS.	Q1	IF3, 150	2	0146-4760 EISSN 1945-2403
Microchemical Journal	2019	The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years.	Q1	IF3, 594	-	0026-265X
Acta Toxicol. Argent.	2019	Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascarador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Preliminary study.	-	-	-	0327-9286
Ciencia e Investigación	2016	Avances en la diferenciación del consumo tradicional de la hoja de coca del consumo ilícito de cocaína.	-	-	-	0009-6733

AUTORES, COAUTORES DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS Y SU CORRESPONDIENTE FILIACIÓN

REVISTA	TÍTULO	DOI	AUTOR-COAUTORES	FILIACIÓN
Forensic Science International	Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing.	10.1016/j.forsci-int.2019.09.005	N.C. Rubio a-c, S. Strano-Rossi b, M.J. Tabernero c, L. Anzillotti b, M. Chiarotti b, A.M. Bermejo c.	a Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina; b Institute of Legal Medicine, University of Legal Medicine, S. Cuore, Rome, Italy; c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.
Forensic Science International	Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases.	10.1016/j.forsci-int.2019.02.024	N.C. Rubio a-c, S. Strano-Rossi b, M.J. Tabernero c, L. Anzillotti b, M. Chiarotti b, A.M. Bermejo c.	a Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina; b Institute of Legal Medicine, University of Legal Medicine, S. Cuore, Rome, Italy; c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.
Forensic Science International	Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco" (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations.	10.1016/j.forsci-int.2019.01.040	N.C. Rubio a-c, F. Krumbiegel b, F. Pragst b, M. Thurnann b, A. M. Bermejo c, E. Alvarez-Freire c, P. Bermejo-Barrera b, M.J. Tabernero-Duque c, A.M. Bermejo c.	a Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina; b Institute of Legal Medicine, University of Legal Medicine, S. Cuore, Rome, Italy; c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.
Drug Testing and Analysis	Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse.	10.1016/j.drugtest.2019.104215	N.C. Rubio a, c; A. Moreda-Pineiro b; I. Alvarez-Freire c; P. Bermejo-Barrera b; M.J. Tabernero-Duque c; A.M. Bermejo c.	Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina; b Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, Universidad de Santiago de Compostela, Spain; c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.
Int. J. Legal Med	Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios.	10.1007/s00414-014-1061-6	Nelida C. Rubio a-c; Martin Hastedt b; Jorge González a; Fritz Pragst b.	a Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina; b Institute of Legal Medicine, University of Legal Medicine, S. Cuore, Rome, Italy; c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.
Journal of Analytical Toxicology	Development of a Reliable Method for Assessing coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC-MS-MS.	10.1002/dta.1972	Nelida Cristina Rubio a-c, Denise Thurnann b; Franziska Krumbiegel b, Fritz Pragst b.	a Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina; b Institute of Legal Medicine, University of Legal Medicine, S. Cuore, Rome, Italy; c Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.
Microchemical Journal	The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years.	10.1093/jat/bky076	Ana M. Bermejo c; Antonio J. Moreda-Pineiro c	Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia 1, Argentina; Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, Universidad de Santiago de Compostela, Spain 2; Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain 3.
Acta Toxicol. Argent.	Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascarador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Preliminary study.	-	Rubio, Nelida Cristina a-c; Moreda-Pineiro A.b; Bermejo-Barrera P.b; Bermejo A.M.c	Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia a, Argentina; Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, Universidad de Santiago de Compostela, Spain b; Institute of Legal Medicine, Universidad de Santiago de Compostela, Spain c.
Ciencia e Investigación	Avances en la diferenciación del consumo tradicional de la hoja de coca del consumo ilícito de cocaína.	-	Nelida C Rubio	Forensic Toxicology Laboratory, Patagonia, Argentina.

Contribución del doctorando y coautores a los trabajos publicados

En las publicaciones mencionadas previamente la actividad del doctorando consistió:

- 1- Búsqueda bibliográfica.
- 2- Diagramación del trabajo.
- 3- Búsqueda de las muestras del grupo de los mascadores de hojas de coca habituales y de los voluntarios tanto mascadores como bebedores de té de coca. Contactar con la Fundación Convivir para la autorización y recolección de muestras de adictos a cocaína fumable y esnifada en tratamiento.
- 4- Diseñar el protocolo para validar los métodos, procesar las muestras.
- 5- Analizar y sacar conclusiones de los resultados
- 6- Escribir los papers y pósteres.

Los coautores de las publicaciones hicieron un importante soporte al trabajo del doctorando sin el cual hubiera sido prácticamente imposible la realización de los mismos. Fueron varios los laboratorios en los cuales se desarrollaron los trabajos publicados, por lo que el doctorando necesitó del auxilio técnico y científico de los coautores para la familiarización del laboratorio, el desarrollo de las técnicas, como así también para el manejo de los instrumentos. Además, dieron soporte al doctorando en la corrección de los papers y pósteres y fueron de consulta para las dudas que se presentaron durante el trabajo analítico y de procesamiento de resultados.

Algunos de los coautores fueron parte imprescindible en la toma de las muestras y en la entrevista a los voluntarios.

Todo el trabajo científico realizado en esta tesis estuvo siempre supervisado por ambos directores de tesis los Dres. Ana M. Bermejo y Fritz Pragst.

LINKS A LAS PUBLICACIONES

REVISTA	TÍTULO	DOI	LINK
Forensic Science International	Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing.	10.1016/j.forsci-int.2012.09.005	https://doi.org/10.1016/j.forsci-int.2012.09.005
Forensic Science International	Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases.	10.1016/j.forsci-int.2014.02.024	https://doi.org/10.1016/j.forsci-int.2014.02.024
Forensic Science International	Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco" (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations.	10.1016/j.forsci-int.2019.01.040	https://doi.org/10.1016/j.forsci-int.2019.01.040
Drug Testing and Analysis	Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse.	10.1016/j.microc.2019.104215	https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104215
Int. J. Legal Med	Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios.	10.1007/s00414-014-1061-6	https://doi.org/10.1007/s00414-014-1061-6
Journal of Analytical Toxicology	Development of a Reliable Method for Assessing coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC-MS-MS.	10.1002/dta.1972	https://doi.org/10.1002/dta.1972
Microchemical Journal	The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years.	10.1093/jat/bky076	https://doi.org/10.1093/jat/bky076
Acta Toxicol. Argent.	Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascarador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Preliminary study.	Acta Toxicol. Argent. - (2019) 27 (2): 72-80	https://toxicologia.org.ar/wp-content/uploads/2020/01/ATA2019v2702.pdf
Ciencia e Investigación	Avances en la diferenciación del consumo tradicional de la hoja de coca del consumo ilícito de cocaína.	CIENCIA E INVESTIGACIÓN - TOMO 66 Nº 2 - 2016	http://aargentinaapciencias.org/wp-content/uploads/2018/01/RevistasCel/tomo66-2/2-Rubio-cei66-2-3.pdf

PERMISOS Y LICENCIAS PARA LA INCLUSIÓN DE LAS COPIAS (FULL TEXT)
DE LOS ARTICULOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS

REVISTA	TÍTULO	DOI	LINK
Forensic Science International	Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing.	10.1016/j.forsci-int.2012.09.005	Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not require.
Forensic Science International	Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases.	10.1016/j.forsci-int.2014.02.024	Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not require.
Forensic Science International	Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco" (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations.	10.1016/j.forsci-int.2019.01.040	Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not require.
Drug Testing and Analysis	Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse.	10.1016/j.jmiloc.2019.104215	Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not require.
Int J Legal Med	Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine cinnamoyl(cocaine and cocaine metabolite/ cocaine ratios.	10.1007/s00414-014-1061-6	5143561109378
Journal of Analytical Toxicology	Development of a Reliable Method for Assessing coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC-MS-MS.	10.1002/dta.1972	5143740198070
Microchemical Journal	The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years.	10.1093/jat/bky076	5143731340985
Acta Toxicol. Argent.	Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un masador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Preliminary study.	Acta Toxicol. Argent. (2019) 27 (2): 72-80	ACCESO ABIERTO
Ciencia e Investigación	Avances en la diferenciación del consumo tradicional de la hoja de coca del consumo ilícito de cocaína.	CIENCIA E INVESTIGACIÓN - TOMO 66 N° 2 - 2016	ACCESO ABIERTO

Nota: se adjuntan los derechos de autor y las licencias obtenidas para cada artículo.



Home



Help ▾



Live Chat



Nelida Rubio ▾



The probability to detect cocaine, methylecgonine, cinnamoylcocaine, hygrine and cuscohygrine in urine samples of coca leaves chewers after six years

Author:

N.C. Rubio, A. Moreda-Piñeiro, J. Álvarez-Freire, P. Bermejo-Barrera, M.J. Tabernero-Duque, A.M. Bermejo

Publication: Microchemical Journal**Publisher:** Elsevier**Date:** December 2019

© 2019 Published by Elsevier B.V.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)



Home



Help ▾



Live Chat



Nelida Rubio ▾



Development of a Reliable Method for Assessing Coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC-MS-MS

Author: Rubio, Nelida Cristina; Bermejo-Barrera, Pilar

Publication: Journal of Analytical Toxicology

Publisher: Oxford University Press

Date: 2018-11-03

Copyright © 2018, Oxford University Press

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Dr. Nelida Rubio ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5143731340985

[Printable Details](#)

License date Sep 07, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Journal of Analytical Toxicology
Licensed Content Title	Development of a Reliable Method for Assessing Coca Alkaloids in Oral Fluid by HPLC-MS-MS
Licensed Content Author	Rubio, Nelida Cristina; Bermejo-Barrera, Pilar
Licensed Content Date	Nov 3, 2018
Licensed Content Volume	43
Licensed Content Issue	3

Order Details

Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	Author of this OUP content
Format	Print and electronic
Portion	Text Extract
Number of pages requested	7
Will you be translating?	No

About Your Work

Title	Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios
Institution name	Santiago de Compostela University
Expected presentation date	Sep 2021

Additional Data

Portions	All
----------	-----



Home



Help ▾



Live Chat



Nelida Rubio ▾



Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse

Author: Nelida Cristina Rubio, Denise Thurmman, Franziska Krumbiegel, Fritz Pragst

Publication: Drug Testing and Analysis

Publisher: John Wiley and Sons

Date: Mar 22, 2016

Copyright © 2016, John Wiley and Sons

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Dr. Nelida Rubio ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5143740198070

[Printable Details](#)

License date Sep 07, 2021

📄 Licensed Content

Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Drug Testing and Analysis
Licensed Content Title	Behaviour of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast with cocaine abuse
Licensed Content Author	Nelida Cristina Rubio, Denise Thurmman, Franziska Krumbiegel, Fritz Pragst
Licensed Content Date	Mar 22, 2016
Licensed Content Pages	1

📄 Order Details

Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No

📄 About Your Work

Title	Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios
Institution name	Santiago de Compostela University
Expected presentation date	Sep 2021

📄 Additional Data



Home



Help ▾



Live Chat



Nelida Rubio ▾



Discrimination between chewing of coca leaves or drinking of coca tea and smoking of "paco" (coca paste) by hair analysis. A preliminary study of possibilities and limitations

Author:

N.C. Rubio, F. Krumbiegel, F. Pragst, D. Thurmman, A. Nagel, E. Zytowski, M. Aranguren, J.C. Gorlelo, N. Poliansky

Publication: Forensic Science International

Publisher: Elsevier

Date: April 2019

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)



Home



Help ▾



Live Chat



Nelida Rubio ▾



Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases

Author:

N.C. Rubio,S. Strano-Rossi,M.J. Tabernero,J.L. Gonzalez,L. Anzillotti,M. Chiarotti,A.M. Bermejo

Publication: Forensic Science International**Publisher:** Elsevier**Date:** October 2014*Copyright © 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.*

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)



Home



Help ▾



Live Chat



Nelida Rubio ▾



Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing

Author: C. Rubio, S. Strano-Rossi, M.J. Tabernero, L. Anzillotti, M. Chiarotti, A.M. Bermejo

Publication: Forensic Science International

Publisher: Elsevier

Date: 10 April 2013

Copyright © 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Journal Author Rights

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

[BACK](#)[CLOSE WINDOW](#)



Home



Help ▾



Live Chat



Nelida Rubio ▾

Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios

SPRINGER NATURE

Author: Nelida Cristina Rubio et al

Publication: International Journal of Legal Medicine

Publisher: Springer Nature

Date: Aug 20, 2014

Copyright © 2014, Springer-Verlag Berlin Heidelberg

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Dr. Nelida Rubio ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

License Number 5143561109378

[Printable Details](#)

License date Sep 07, 2021

Licensed Content

Licensed Content Publisher Springer Nature

Licensed Content Publication International Journal of Legal Medicine

Licensed Content Title Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios

Licensed Content Author Nelida Cristina Rubio et al

Licensed Content Date Aug 20, 2014

Order Details

Type of Use Thesis/Dissertation

Requestor type academic/university or research institute

Format print and electronic

Portion full article/chapter

Will you be translating? yes, including original language

Number of languages 1

Circulation/distribution 1 - 29

Author of this Springer Nature content yes

About Your Work

Title Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios

Institution name Santiago de Compostela University

Expected presentation date Sep 2021

Additional Data

Specific Languages Spain; English





